

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALINE PEREIRA

**Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos
provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (Musa spp)**

**Florianópolis
2010**

ALINE PEREIRA

**Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos
provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (Musa spp)**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Co-orientadora: Sandra Regina Salvador Ferreira**

**Florianópolis
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

P436a Pereira, Aline

Avaliação das atividades antitumoral e cicatrizante de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (Musa spp) [dissertação] / Aline Pereira ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa. - Florianópolis, SC, 2010.

155 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Musa spp. 3. Casca de banana. 4. Cicatrização. 5. Atividade antitumoral. 6. Estresse Oxidativo. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

**Aos meus pais, Francisco e Dirce (*in memoriam*),
que se doaram por inteiro e renunciaram aos seus sonhos,
para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas minhas conquistas.

Aos meus pais, Francisco e Dirce (*in memoriam*), pelo exemplo de vida, companheirismo, apoio e amor incondicionais. Meus eternos incentivadores.

À minha orientadora, Dra. Rozangela Curi Pedrosa, por ter aberto as portas do LABIOEX e proporcionado mais essa etapa do meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Professora Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira, co-orientadora desse trabalho, e sua equipe, em especial à Sibelee Recco Rosso, por ter fornecido os extratos testados e também pela paciência e atenção no esclarecimento de minhas dúvidas.

Ao professor Dr. Danilo Wilhelm Filho pelo carinho, atenção e também por ceder gentilmente seu laboratório para a realização de boa parte desse trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo Cargnin Ferreira pelo auxílio no estudo histológico das lesões.

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin por disponibilizar o seu precioso tempo no auxílio das atividades realizadas no Laboratório de Fitotecnia e Morfogênese Vegetal.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

À Joice Ferrari da Costa, secretária do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Uma pessoa muito querida, extremamente competente e atenciosa. (Agradeço pelos lembretes via e-mail e por todo o apoio!)

À professora Dra. Regina Vasconcellos Antônio pela ajuda nas situações de dificuldade.

Ao meu irmão Eduardo pelas incansáveis caronas. (Valeu Ado!)
E ao Fabricio também.

À minha tia Nanda pelo companheirismo e pela ajuda nos almoços de domingo.

Ao meu tio Meréco pelo humor sarcástico e pelas mesadas extras. (Capaz!)

Às minhas amigas Rarietty, Susana, Carolina e Andréia pelos momentos de descontração. E, principalmente, por essa amizade que perdura desde os tempos do Colégio de Aplicação. (Adoro vocês!)

Aos colegas de laboratório Ana Claudia Vieira, Carla Baron, Eduardo Antonio Ferreira, Eduardo Benedetti Parisotto, Fernanda Biscaro, Fernando Sérgio de Lima Cantanhede, João Francisco Gomes Correia, Karina Bettega Felipe, Maicon Kviecinski, Sandra Joseane Fernandes Garcia e Tânia M. Fischer Günther, com os quais aprendi muito. (Muito obrigada!)

Às colegas Cristhiane Guertler, Liege Cantelli e Paula Terra Bandeira, do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura e sob a orientação da professora Dra. Margherita Anna Barracco, que disponibilizaram a Leitora de ELISA e auxiliaram os procedimentos de leitura. (Agradeço de coração a acolhida no LIAA!)

À minha cachorrinha Nina, por sempre me receber de uma forma ímpar todas as vezes que chego em casa. A alegria da minha vida em qualquer momento.

À CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais..... | 41 |
| Tabela 2. Resultados referentes à determinação de galocatequina em amostras de extratos de casca de banana Musa spp. (EBAQ: extrato bruto aquoso, EBHE: extrato bruto hidroetanólico e ESC: extrato derivado de extração supercrítica) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 67 |
| Tabela 3. Período de epitелização para conclusão do processo cicatricial observado através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com extratos de casca de banana Musa spp (EBAQ e EBHE)..... | 69 |
| Tabela 4. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CN observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com água (veículo)..... | 85 |
| Tabela 5. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CP observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com alantoína..... | 85 |
| Tabela 6. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CIEBAQ observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo..... | 86 |
| Tabela 7. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CILEBAQ observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo..... | 86 |
| Tabela 8. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo EBAQL observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 | |

dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com EBAQ.....87

Tabela 9. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo EBAQSL observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com EBAQ.....88

Tabela 10. Resultados obtidos com o teste de correlação não-paramétrica de Spearman entre os parâmetros microscópicos do estudo histológico da lesão, bem como em relação ao conteúdo de hidroxiprolina, entre os grupos de tratamento (CN, CP, EBAQL e EBASL).....89

Tabela 11. Parâmetros morfohistocitológicos que caracterizam potencial atividade antitumoral do EBAQ.....102

Tabela 12. Parâmetros morfohistocitológicos que caracterizam potencial atividade antitumoral do extrato derivado de ESC.....103

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Banana..... | 25 |
| Figura 2. Plátano..... | 25 |
| Figura 3. Fotos da coleção cultivares de bananeira <i>Musa</i> spp., com cacho ainda em formação, obtidas na estação experimental de Urussanga, Santa Catarina..... | 26 |
| Figura 4. Estrutura química da galocatequina, flavonóide presente na casca de banana..... | 29 |
| Figura 5. Estrutura química geral dos flavonóides..... | 29 |
| Figura 6. Fotomicrografia de corte da planta do pé humano, em que podem ser observadas as várias camadas da pele..... | 33 |
| Figura 7. Fases do reparo de uma lesão na pele: a. Inflamação: duração de até 48 horas. b. Formação de tecido novo: ocorre cerca de 2-10 dias após a lesão c. Remodelação: duração de um ano ou mais..... | 38 |
| Figura 8. Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água..... | 42 |
| Figura 9. Reações de formação de radical hidroxil..... | 42 |
| Figura 10. Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas..... | 47 |
| Figura 11. padrão de galocatequina, cuja equação corresponde a $y=b.x$, onde $b=795,09$ e $r^2=0,997$ | 66 |
| Figura 12. Perfil cromatográfico (280 nm) dos extratos (EBAQ, EBHE e extrato derivado de ESC) de casca de <i>Musa</i> spp. O pico da galocatequina está indicado com um asterisco (*), com tempo de retenção correspondente a 6,5 minutos..... | 67 |
| Figura 13. Porcentagem de redução da lesão observada a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana <i>Musa</i> spp (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de | |

excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada barra representa média \pm erro padrão da média (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....68

Figura 14. Conteúdo de hidroxiprolina determinado a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....70

Figura 15. Nível de peroxidação lipídica a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles.. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....72

Figura 16. Nível de carbonilação protéica a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....74

Figura 17. Conteúdo de GSH a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....75

Figura 18. Atividade da CAT a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6,

por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....76

Figura 19. Atividade da SOD a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana Musa spp (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....78

Figura 20. Atividade da GPx a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana Musa spp (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....79

Figura 21. Atividade da GST a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana Musa spp (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão (n=6, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico).....80

Figura 22. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 3 dias de tratamento . Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento). Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x.....82

Figura 23. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 6 dias de tratamento . Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento). Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x.....90

Figura 24. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 9 dias de tratamento . Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento). Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x.....91

Figura 25. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 12 dias de tratamento . Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento). Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x.....92

Figura 26. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 15 dias de tratamento . Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento). Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x.....93

Figura 27. Efeito do EBAQ de casca de banana *Musa spp.* sobre a viabilidade celular em células de TAE no ensaio de viabilidade celular (teste do MTT).....100

Figura 28. Porcentagem de inibição do TAE referente ao tratamento com EBAQ e extrato derivado da ESC de casca de banana *Musa spp.*.....102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ANOVA | Análise de Variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ACS | <i>American Cancer Society</i> |
| AIDS | <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> |
| CAT | Catalase |
| CI ₅₀ | Concentração Inibitória 50 % |
| CDNB | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CI | Controle Interno |
| CIEBAQ | Controle Interno dos animais que não sofrerão excisão tecidual e receberam aplicação de EBAQ |
| CILEBAQ | Controle Interno dos animais que sofreram excisão tecidual e foram tratados com EBAQ |
| CN | Controle Negativo |
| CP | Controle Positivo |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DP | Desvio Padrão |
| DPTA | Ácido Dietilenotriaminopentacético |
| DTNB | Ácido Ditionitrobenzóico |
| EBAQ | Extrato Bruto Aquoso |
| EBAQL | Animais submetidos à cirurgia para excisão tecidual e que receberam tratamento com EBAQ |
| EBASL | Animais não submetidos à cirurgia e que receberam tratamento com EBAQ |
| EBHE | Extrato Bruto Hidroetanólico |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EPAGRI | Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina |
| ERNs | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| ESC | Extração Supercrítica |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FGF2 ou bFGF | Fator 2 de Crescimento de Fibroblastos |
| GMPc | Guanozina Monofosfato Cíclico |
| GPx | Glutathione Peroxidase |
| GR | Glutathione Redutase |

| | |
|--------------------|---|
| GSH | Glutathione Reduzida |
| GSSG | Glutathione Oxidada |
| GST | Glutathione S-transferase |
| IARC | Agência Internacional para Pesquisa em Câncer |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| INIBAP | <i>International Network For The Improvement Of Banana And Plantain</i> |
| LABIOEX | Laboratório de Bioquímica Experimental |
| LATESC | Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica |
| LDL | <i>Low Density Lipoprotein</i> |
| MDA | Malondialdeído |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MTT | Sal de Tetrazólio |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Difosfato Reduzida |
| NAD(P)H oxidase | Enzima NAD(P)H Oxidase |
| PAE | <i>Plagiochasma appendiculatum</i> |
| PAF | <i>Platelet Activating Factor</i> |
| PAL | Percentual de Aumento da Longevidade |
| RL | Radical Livre |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TAE | Tumor Ascítico de Ehrlich |
| TBA | Ácido Tiobarbitúrico |
| TBARS | <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| TMS | Taxa Média de Sobrevida |
| TNB | Ânion Tiolato |
| TUHH | <i>Technische Universitat Hamburg-Harburg</i> |
| UV | Ultravioleta |
| VEGF | Fator de Crescimento do Endotélio Vascular |
| VEGFA | Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| AcOH | Ácido Acético |
| HOBr | Ácido hipobromoso |
| HOCl | Ácido hipocloroso |
| H ₂ O | Água |
| ROONO | Alquil peroxinitrito |
| O ₂ | Átomo de Oxigênio Molecular |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de Sódio |
| NO ⁺ | Cátion Nitroso |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| <i>g</i> | Aceleração da Gravidade |
| -SH | Grupamento tiol |
| Cu ²⁺ | Íon Cúprico |
| Cu ³⁺ | Íon Cuproso |
| Fe ²⁺ | Íon Ferroso |
| Fe ³⁺ | Íon Férrico |
| HClO ⁻ | Íon Hipocloroso |
| η-BuOH | n-Butanol |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| RO [•] | Radical Alcoxil |
| O ₂ ^{•-} | Radical Ânion Superóxido |
| NO ₂ [•] | Radical Dióxido de nitrogênio |
| HO ₂ ^{•-} | Radical Hidroperoxil |
| •OH | Radical Hidroxil |
| RO ₂ [•] | Radical Peroxil |
| NO | Óxido nítrico |
| ¹ O ₂ | Oxigênio singlete |
| O ₃ | Ozônio |
| -SS- | Pontes Dissulfeto |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |

RESUMO

Na medicina popular brasileira, a casca de banana tem um histórico de uso na cura de lesões por queimadura. Compostos antioxidantes têm sido isolados de diferentes fontes naturais e possuem um papel importante na prevenção e cura de doenças, como o câncer por exemplo. O objetivo deste estudo foi avaliar os extratos provenientes da casca de banana (*Musa spp.*) (EBAQ: extrato bruto aquoso; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; ESC: extrato derivado de extração supercrítica) no processo de cicatrização de lesões, considerando seu potencial antioxidante, e quanto a sua atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Para avaliar o potencial cicatrizante dos extratos, camundongos isogênicos Balb/C (peso 20 ± 2 g, $n = 6$) foram submetidos ao modelo de excisão e foram divididos em grupo controle negativo (CN), que receberam topicamente água durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias, grupo controle positivo (CP), que receberam topicamente solução de alantoina (50 mg/kg/dia) durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias e grupos tratados topicamente com os EBAQ e EBHE (50 mg/kg/dia), conforme os grupos controle. O potencial cicatrizante e as defesas antioxidantes foram avaliados. Os resultados foram estatisticamente significativos quando comparados com os grupos CN e CP. Os tratamentos com EBAQ e EBHE foram capazes de diminuir o período de epitelização e a cicatrização das lesões se deu em 9 dias, aumentar o teor de hidroxiprolina, diminuir a peroxidação lipídica e o conteúdo de proteína carbonilada nos tecidos cicatriciais, aumentar o teor de glutathione reduzida tendendo ao nível basal, diminuir as atividades das enzimas catalase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase e diminuir a atividade da superóxido dismutase demonstrando uma tendência ao nível basal. O estudo histológico da lesão foi realizado com o emprego do EBAQ para o tratamento das lesões, o qual foi o mais eficaz na análise de atividade cicatrizante, quando comparado ao tratamento com EBHE. Os resultados do estudo histológico da lesão confirmaram o potencial cicatrizante do EBAQ, uma vez que mostraram proliferação de fibroblastos e indução do processo de reepitelização. EBAQ, EBHE e ESC foram analisados em relação a atividade antitumoral *in vitro*. Apenas o EBAQ apresentou citotoxicidade *in vitro* contra as células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), com CI_{50} correspondente a 152,83 mg/mL. O EBHE não apresentou atividade no ensaio de citotoxicidade *in vitro* e não foi analisado no modelo *in vivo* para avaliar a atividade antitumoral. O ESC também não apresentou atividade no ensaio de citotoxicidade *in vitro* contra as células do TAE. Porém, apresentou

elevada toxicidade quando aplicado no modelo de excisão em camundongo para avaliação do potencial cicatrizante. Por isso, foi aplicado aos ensaios de atividade antitumoral *in vivo*. Avaliações morfológicas em camundongos isogênicos Balb/C portadores de TAE (peso de 20 ± 2 g, n = 6) mostraram que os animais tratados com o EBAQ e o ESC apresentaram diminuição significativa do peso corporal (~ 67 % e ~ 79 %, respectivamente) e no crescimento do TAE (~ 57 % e ~ 49 %, respectivamente), quando comparados ao grupo CN. EBAQ e ESC foram capazes de aumentar o número de células inviáveis (4 vezes e 2 vezes, respectivamente) e a porcentagem média de sobrevivência dos animais (~ 23 % e ~ 22 %, respectivamente), quando comparados ao grupo CN. Esses achados indicam que os EBQA e EBHE têm potencial cicatrizante que pode estar associado às suas propriedades antioxidantes. Além disso, os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* e de atividade antitumoral *in vivo* são importantes indícios de uma possível aplicação de extratos da casca de Musa spp. casca (EBAQ e ESC) no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Musa spp., Casca de banana, Cicatrização, Atividade antitumoral, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

In Brazilian popular medicine banana peel has a history of utility in burn healing. Antioxidant compounds have been isolated from different natural sources and play an important role in disease prevention and cure, such as cancer. The aim of this study was to evaluate *Musa* spp. peel extracts (ACE: aqueous crude extract; HCE: hydroethanol crude extract; SCE: supercritical extract) in wound healing process, considering its antioxidant potential, and its antitumoral activity *in vitro* and *in vivo*. To evaluate wound healing potential, Balb/C mice (weight 20 ± 2 g, $n=6$) were cutaneous by injured and were divided in negative control group (NC), which received topically water during 3, 6, 9, 12 and 15 days, positive control group (PC), which received topically allantoin solution (50 mg/kg/day) during 3, 6, 9, 12 and 15 days, and treated groups which, received topically ACE and HCE (50 mg/kg/day), as in the control groups. Results were statistically significant when compared with NC and PC groups. ACE and HCE treatments were able to decrease the epithelization period and healing the lesions in 9 days, to increase the hydroxyproline content, to decrease lipid peroxidation and carbonyl protein contents in healing tissues, to increase reduced glutathione content with a basal level tendency, to decrease catalase activity, decrease superoxide dismutase activity showing a tendency to basal level and to decrease glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities during all treatment period. Lesion histological study was performed with ACE treatment which was the most effective in wound healing evaluation when compared to HCE treatment. The results of lesion histological study confirmed the ACE healing potencial, since it showed fibroblast proliferation and induction of reepithelialization process. ACE, HCE and SCE were analyzed in respect to *in vitro* antitumoral activity. Only ACE showed *in vitro* cytotoxicity to Ehrlich ascites tumor (EAT) with IC_{50} corresponding to 152.83 mg/mL. HCE did not show *in vitro* cytotoxicity to EAT and it was not applied to the *in vivo* model to evaluate antitumoral activity. SCE did not show *in vitro* cytotoxicity to EAT, however, it showed high toxicity when applied in wound healing model. Because of this, SCE was applied to *in vivo* antitumoral assays. Morphological evaluations in EAT-bearing Balb/C mice (weight 20 ± 2 g, $n=6$) showed that animals treated with ACE and SCE presented significant reduction in the body weight ($\sim 67\%$ and $\sim 79\%$, respectively), and in EAT growth ($\sim 57\%$ and 49% , respectively) when compared to the NC group. ACE and SCE were able to increase the

inviability cell number (~ 4 times and ~ 2 times, respectively), the average percentage of survival of animals (~ 23 % and ~22 %, respectively) when compared to the NC group. These findings indicate that ACE and HCE have a wound healing potential that may be associated to their antioxidant activity. They also indicate that *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* antitumoral activity are important indications of a possible application of extracts of *Musa* spp. peel (ACE and SCE) in cancer treatment.

Keywords: *Musa* spp., Banana peel, Wound healing, Antitumoral activity, Oxidative stress.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1. Introdução..... | 23 |
| 1.1. Plantas medicinais e etnofarmacologia..... | 23 |
| 1.2. A banana..... | 24 |
| 1.3. As cascas de bananas e estudos relacionados..... | 26 |
| 1.4. Flavonóides..... | 29 |
| 1.5. A cicatrização..... | 31 |
| 1.6. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes na cicatrização..... | 39 |
| 1.7. O câncer..... | 47 |
| 2. Objetivos..... | 51 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 51 |
| 2.2. Objetivo específico..... | 51 |
| 3. Materiais..... | 51 |
| 3.1. Matéria-prima e produção de extratos..... | 52 |
| 3.2. Animais..... | 55 |
| 3.3. Manutenção do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)..... | 56 |
| 4. Metodologia..... | 56 |
| 4.1. Determinação de galocatequina em extratos de casca de banana Musa spp. por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 56 |
| 4.2. Atividade cicatrizante..... | 57 |
| 4.3. Atividade antitumoral..... | 63 |
| 4.4. Análise estatística..... | 66 |
| 5. Resultados..... | 66 |
| 5.1. Determinação de galocatequina em extratos de casca de banana Musa spp. por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 66 |
| 5.2. Atividade cicatrizante..... | 68 |
| 5.3. Atividade antitumoral..... | 100 |
| 6. Discussão..... | 103 |
| 6.1. Métodos de extração e determinação de galocatequina em extratos de casca de banana Musa spp. por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 103 |
| 6.2. Atividade cicatrizante..... | 110 |
| 6.3. Atividade antitumoral..... | 131 |
| 7. Conclusões..... | 135 |
| 8. Perspectivas..... | 137 |
| 9. Referências bibliográficas..... | 138 |

1. Introdução

1.1. Plantas medicinais e etnofarmacologia

O reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, estimada em cerca de 20 % do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003). Entretanto, apesar das plantas serem consideradas uma das principais fontes de produtos naturais biologicamente ativos, seu potencial ainda é desconhecido, pois apenas 15 a 17 % foram estudadas quanto a sua aplicação medicinal (SOEJARTO, 1996; VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Desde a Antiguidade, as plantas são fontes de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana. O desenvolvimento da terapêutica moderna não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, principalmente das plantas superiores. Estima-se que até 75 % dos medicamentos mais prescritos e vendidos mundialmente foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Os antitumorais e os antibióticos, por exemplo, perfazem cerca de 70 % (CRAGG; NEWMAN, 1999; CALIXTO; YUNES, 2001).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009), cerca de 65 % a 80 % da população mundial não tem acesso ao atendimento primário de saúde. Além disso, é limitado o acesso aos recursos medicinais disponíveis, principalmente, devido aos seus custos elevados. Por isso, a população recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio e da cura para muitas doenças (ELISABETSKY, 1987). Sendo assim, as plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos em processos patológicos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. E é evidente a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos efetivos contra patologias ainda sem tratamento adequado, e que possam substituir os existentes, porém a custos menores e dotados de menores efeitos adversos. A comunidade científica é assim impulsionada a novas e incessantes pesquisas nessa área.

Muitas estratégias podem ser consideradas para a investigação das atividades biológicas das plantas medicinais, entre elas a abordagem etnofarmacológica. A etnofarmacologia consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais e pessoas experientes, que fazem uso da flora medicinal, com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados

(ELISABETSKY, 1987). Várias são as espécies vegetais capazes de gerar pesquisa e desenvolvimento baseada na alegação de um dado efeito terapêutico, podendo tornar-se uma valiosa ferramenta para a descoberta de novos fármacos.

Estudos químicos e farmacológicos envolvendo extratos de produtos naturais têm voltado ao cenário científico mundial nas últimas décadas devido, especialmente, a caracterização de novos compostos com atividade terapêutica e em função dos altos custos com pesquisa e elaboração de medicamentos sintéticos, além da diminuição da disponibilidade de matérias-primas (SIMÕES et al., 2001). Conseqüentemente, existe uma ênfase considerável na recuperação, reciclo e melhoramento dos resíduos. Dependendo da tecnologia empregada, existe a possibilidade desses materiais residuais serem convertidos em produtos comerciais tanto como matéria-prima para processos secundários, como ingredientes de novos produtos, adquirindo assim considerável valor agregado (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). A casca de banana *Musa* spp. se insere nesse contexto, devido à elevada geração desse resíduo e também por possuir histórico de uso popular como agente cicatrizante, além de outras propriedades relacionadas à prevenção e ao tratamento de patologias como o câncer e doenças cardiovasculares.

A pesquisa sobre as atividades cicatrizante e antitumoral de *Musa* spp. (Musaceae) realizada neste trabalho surgiu a partir da realização de um levantamento etnofarmacológico prévio como o ponto de partida. Foram procurados relatos populares sobre a utilização das cascas de banana em processos cicatriciais e no tratamento de tumores. E de acordo com o descrito na literatura, estão presentes na composição química da casca de banana compostos que já possuem comprovada atividade biológica.

1.2. A Banana

Karl Von Lineé (1707-1778) foi botânico, zoólogo, médico e o criador da nomenclatura binomial e da classificação científica e, por isso, é considerado o pai da taxonomia moderna. Karl Von Lineé classificou as espécies de bananas nomeando-as *Musa paradisiaca* e *Musa sapientum*. Entretanto, em 1955, os botânicos Simond e Sheperd concluíram que não existiam duas espécies de banana. Na verdade, as bananas diferiam somente no seu arranjo da ploidia.

A palavra banana é um termo geral que engloba um número de espécies ou híbridos do gênero *Musa* da família Musaceae. Entre os

híbridos de bananas podemos citar conforme a nomenclatura popular a banana prata, banana branca, banana nanica, banana-maçã, banana-d'água ou caturra e a banana-da-terra.

A maioria das cultivares comestíveis deriva de duas espécies diplóides *Musa acuminata* (AA) e *Musa balbisiana* (BB). Além disso, existem híbridos triplóides e tetraplóides compondo subespécies de *M. acuminata* e subespécies entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*. As bananeiras que produzem frutos comestíveis são da espécie *Musa acuminata* (genoma A) ou do seu cruzamento com a e *Musa balbisiana* (genoma B). Os grupos varietais agrupam variedades de características semelhantes: Cavendish – grupo genômico AAA (Nanica, Nanicão, Grand Naine e Caipira); Ouro – grupo genômico AA (Ouro); Maçã – grupo genômico AAB (Maçã, Mysore, Thap Maeo e Figo) e Prata – grupo genômico AAB (Prata, Prata Anã, Pacovan e Branca). As frutas de variedade do tipo AA e AAA são mais doces, enquanto as do tipo AAB, são mais ácidas. Existem também bananas do tipo AAB que possuem maior teor de amido, e são consumidas tipicamente após cozimento ou fritura. A classificação das bananas de mesa (banana) ou de cozinhar (plátano) é o resultado do cruzamento natural entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*. Portanto, não é correto referir *M. sapientum*, *M. paradisiaca*, *M. cavendish* (INIBAP, 2002).



Figura 1. Banana



Figura 2. Plátano

As bananas (Figura 1) são originárias do sudeste da Ásia. Hoje em dia, são cultivadas em praticamente todas as regiões tropicais do planeta. Vulgarmente, inclusive para efeitos comerciais, o termo "banana" refere-se às frutas de polpa macia e doce que podem ser consumidas cruas. Contudo, há variedades cultivares de polpa mais rija e de casca mais firme e verde, geralmente designadas por plátanos, banana-pão ou *plantains* (Figura 2), que são consumidas cozinhadas (fritas, cozidas ou assadas). Bananas e plátanos estão entre os principais recursos alimentícios no mundo. Essas culturas ocupam o quarto lugar

no *ranking* mundial dos alimentos mais importantes, depois do arroz, milho, e leite (FAO, 2009; INIBAP, 2002).

A banana é cultivada em uma centena de países, principalmente nas regiões tropicais, onde é fonte de alimento e renda para milhões de pessoas. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2009), o país com maior produção mundial de bananas é a Índia. O Brasil é o 2º maior produtor mundial, com ampla disseminação da cultura em seu território. A bananicultura ocorre em todos os estados brasileiros, sendo o Estado de Santa Catarina o terceiro maior produtor (IBGE, 2009) (Figura 3).

Economicamente, a banana destaca-se como a segunda fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor da produção e consumo. É cultivada por grandes, médios e pequenos produtores, sendo 60% da produção proveniente da agricultura familiar (EMBRAPA, 2009). O consumo *per capita* anual brasileiro de bananas, no período de 2002 – 2003, foi equivalente a um total de 7,008 kg. A cultivar de banana mais consumida foi a banana prata (2,746 kg), seguida da banana-d'água (1,853 kg), banana-maçã (0,403 kg), banana-da-terra (0,379 kg), banana ouro (0,013 kg), entre outras cultivares (1,614 kg) (IBGE, 2009).

A maior parte da produção brasileira de bananas é consumida *in natura*. O principal produto derivado da banana produzido no Brasil é o purê, correspondendo a 55% do total de produtos industrializados, sendo exportado para o Japão, Estados Unidos e Europa. Também são produzidos, em quantidades consideráveis, a bananada (20%), a banana-passa (13%), os flocos (10%) e os chips (2%). Além dos mencionados, diversos outros produtos podem ser obtidos da banana, entre eles a fruta em calda, a fruta cristalizada, a bala, a farinha, o pó, o suco clarificado simples ou concentrado, o néctar, o vinho, o vinagre, a cerveja, o aguardente, o licor e outros. Como ingrediente, a banana pode ainda ser utilizada em formulações de tortas, bolos, biscoitos, cereais matinais, barras de frutas e cereais, alimentos infantis e dietéticos, iogurtes, sorvetes, bombons, dentre outros (EMBRAPA, 2009).

1.3. As cascas de bananas e estudos relacionados

As cascas de bananas consumidas, geralmente, são utilizadas na alimentação animal, na compostagem ou são simplesmente descartadas (CHARRIER et al., 2004).

O descarte dessas cascas pode causar problemas ambientais. Em países como a Costa Rica, é comum a prática do descarte de excesso e

rejeitos de bananas nos rios. O alto teor de carboidratos da cultura cria elevada demanda bioquímica de oxigênio nos rios e, portanto, reduz as populações de animais aquáticos provocando um desequilíbrio nesse ecossistema (ZHANG et al., 2005).



Figura 3. Fotos da coleção cultivares de bananeira *Musa* spp., com cacho ainda em formação, obtidas na estação experimental de Urussanga, Santa Catarina

Atualmente, existem poucos trabalhos mencionando o aproveitamento desses resíduos. Alguns artigos tratam de diferentes aplicações práticas para a casca de banana, por exemplo a produção de álcool (TEWARI; MARWAHA; RUPAL, 1986), metano (BARDIYA; SOMAYAJI, 1996; GUNASEELAN, 2004), alimentação para gado (ONWUKA; ADETILOYE; AFOLAMI, 1997) ou adsorventes para purificação de água (ANNADURAI; JUANG; LEE, 2004). Dependendo da tecnologia empregada, os materiais residuários podem ser convertidos em produtos comerciais tanto como matéria-prima para processos secundários, como ingredientes de novos produtos com atividade terapêutica. Esses produtos naturais também podem ser utilizados diretamente como compostos funcionais na nutrição humana e na prevenção e cuidados com a saúde. Dentre as inúmeras fontes,

destacamos a obtenção seletiva de frações de compostos presentes na casca de banana que apresenta classes de compostos ativos relevantes (LAUFENBERG, 2003).

Flavonóides, ácidos graxos, fitoesteróis e carotenóides são alguns compostos de alto valor já identificados em cascas de bananas. Davey (2006) quantificou o conteúdo de pró-vitamina A de dois tipos de bananas, *Musa cavendish* e Yangambi-5, e suas cascas. Suas análises demonstraram alto conteúdo de compostos pró-vitamina A, sendo que na casca o conteúdo de carotenóides é maior e mais complexo do que na polpa da banana. Someya, Yoshiki e Okubo (2002) isolaram a galocatequina, um flavonóide do extrato de casca e polpa de banana *Musa cavendish*, e determinaram uma concentração de 158 mg/g de sólido seco para a casca e 29,6 mg/g de sólido seco para a polpa. A galocatequina foi identificada como responsável pelo efeito dos extratos contra a autoxidação lipídica (Figura 4).

Emaga et al. (2007) estudou a composição química das cascas de duas variedades de banana, a *Grand Naine* (Grande Anã) subsespécie Cavendish e a variedade Yankambi subsespécie Ibota e determinou o conteúdo de ácidos graxos. Ambas as variedades apresentaram quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, principalmente, ácido linolêico e α -linolênico que corresponderam a 40% do total de ácidos graxos. No mesmo estudo, o total de lipídeos crus foi avaliado em 5,7% sobre a matéria seca para a variedade *Grand naine* e 10,9% para a variedade Yankambi. Knapp e Nicholas (1969) identificaram os seguintes fitoesteróis e triterpenos na casca de banana: β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, cicloeucalenol, cicloartenol, and 24-metileno cicloartanol. O 24-metileno cicloartanol palmitato representa 30% dos lipídeos totais extraíveis.

A atividade antioxidante proveniente do extrato das cascas de banana (*Musa paradisiaca*) foi estudada utilizando-se modelo experimental de ratos submetidos a uma dieta normal, comparados a ratos com uma dieta rica em ácidos graxos. Os animais tratados por via oral com extrato de casca de banana apresentaram concentrações significativamente diminuídas dos produtos de peroxidação (malondialdeído), hidroperóxidos e dienos conjugados. Ao mesmo tempo, as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase aumentaram significativamente nos animais tratados, assim como as concentrações de glutatona (VIJAYAKUMAR; PRESANNAKUMAR; VIJAYALAKSHMI, 2008).

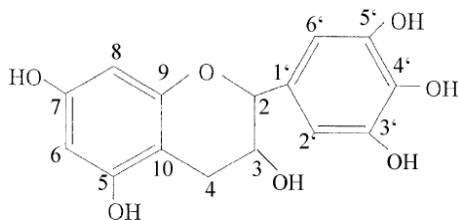


Figura 4. Estrutura química da galocatequina, flavonóide presente na casca banana (SOMEYA; YOSHIKI; OKUBO, 2002).

1.4. Flavonóides

Flavonóides são uma ampla classe de compostos de baixo peso molecular e constituem um grupo muito importante de substâncias fenólicas derivadas do metabolismo vegetal secundário. Os flavonóides são caracterizados pela presença de um núcleo flavona e incluem catequinas, proantocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis e seus glicosídeos. São largamente distribuídos em folhas, sementes, cascas e flores de plantas, sendo que mais de 4 mil flavonóides já foram identificados. Esses compostos são encontrados em abundância nos vegetais e lhes conferem proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros. A maioria dos efeitos benéficos dos flavonóides à saúde é atribuída à sua capacidade antioxidante e quelante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

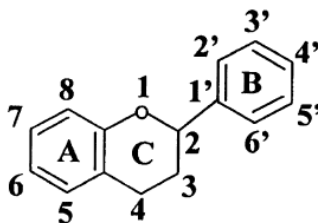


Figura 5. Estrutura química geral dos flavonóides (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

No grupo dos compostos polifenólicos, os flavonóides têm sido amplamente estudados. Os flavonóides são derivados de benzopirona. Sua estrutura química consiste de anéis benzênicos e pirano (Figura 5) e sua classificação é realizada de acordo com as substituições. Os

flavonóides são diferenciados de acordo com o substituinte da cadeia lateral, que pode ser uma hidroxila, um grupamento metóxi ou glicosídico, além da conjugação entre os anéis A e B. Nos alimentos, os flavonóides existem como 3-*O*-glicosídeos e polímeros.

A atividade antioxidante *in vitro* de flavonóides e seus metabólitos depende do arranjo dos grupos funcionais na estrutura nuclear. O estudo sobre a relação estrutura-atividade tem gerado evidências consistentes relacionadas ao papel específico dos componentes estruturais quanto aos requisitos para o *scanveger* de radicais, ação quelante e atividade oxidante de compostos flavonóides (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; PIETTA, 2000).

O potencial antioxidante dos compostos fenólicos pode ser resultante da sua potente atividade *scavenging* de radicais livres além das suas propriedades de oxirredução, as quais permitem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, assim como supressores de oxigênio singlete. Estão largamente distribuídos nas plantas superiores e são capazes de captar o ânion superóxido e radicais hidroxila por transferência de elétron (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Este grupo de compostos polifenólicos em geral contém um número variável de grupos hidroxila ligados às estruturas aromáticas, o que lhes confere a atividade antioxidante (HARBORNE, 1986). Eles também podem apresentar um potencial relacionado à atividade quelante de metais (PATTANAYAK; SUNITA, 2008).

Investigações bioquímicas do mecanismo de ação dos flavonóides têm demonstrado que estes compostos inibem uma grande variedade de sistemas enzimáticos. Entre eles, diversas oxigenases, como a prostaglandina-sintetase, enzima chave na biossíntese de eicosanóides, que tem papel fundamental, na inflamação, sensação dolorosa e reparo tissular. Atuam, também, inibindo a enzima hialuronidase, de forma a preservar os proteoglicanos do tecido conjuntivo e prevenindo a disseminação bacteriana ou de metástases tumorais (HAVSTEEN, 2002). As reações de oxidação, em que os flavonóides são preferencialmente oxidados, preservam antioxidantes naturais do organismo como o ácido ascórbico (KORKINA; AFANAS'EV, 1997).

1.4.1. Catequinas

As catequinas são uma classe de flavonóides com potente propriedade antioxidante e quimiopreventiva contra o câncer. São encontradas em uma grande variedade de plantas e estão presentes

particularmente em elevadas concentrações nas folhas de chá-verde. Altos níveis de (+)-catequina são encontrados tanto nas cascas quanto nas sementes de frutas como a maçã e a uva. O vinho tinto e o chocolate também são fontes consideráveis de (+)-catequina. No caso do vinho tinto, a (+)-catequina é extraída da casca da uva e concentrada durante o processo de fermentação (HERTLOG et al., 1993; KONDO et al., 1999). Já a galocatequina, particularmente, pode ser encontrada em concentrações elevadas nas cascas de banana (SOMEYA, YOSHIKI, OKUBO, 2002). Flavonóides, incluindo a (+)-catequina e a galocatequina, são potentes antioxidantes que seqüestram de forma eficiente uma grande variedade de radicais livres. Estudos relacionados ao efeito biológico de (+)-catequina em cultura de células e em modelos *in vivo* indicam que esse composto pode quelar metais de transição e inibir a peroxidação lipídica. De acordo com a habilidade dos compostos fenólicos antioxidantes de induzir a expressão de enzimas de detoxificação de fase II em células de mamíferos, (+)-catequina pode produzir efeitos antimutagênicos. Flavonóides também apresentam propriedade antiinflamatória e alteram o metabolismo do ácido araquidônico através da inibição das vias enzimáticas que envolvem a lipogenase e a ciclooxigenase (KONDO et al., 1999; SOMEYA, YOSHIKI, OKUBO, 2002).

1.5. A cicatrização

1.5.1. Pele

O maior órgão do corpo humano é a pele ou *cútis*, um manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior, representando 15% do peso corpóreo. Recobre toda a superfície corporal e apresenta grande variação ao longo de sua extensão, sendo ora flexível e elástica, ora mais rígida. Constitui uma estrutura complexa formada por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Em continuidade com a derme há a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (Figura 6).

A camada mais externa da pele é a epiderme, constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Ela apresenta quatro tipos de células: os queratinócitos (as células mais abundantes nesse epitélio), os melanócitos (as células que produzem a melanina, pigmento acumulado na epiderme e que tem função protetora contra os raios ultravioleta), as células de Langerhans (células capazes de captar

antígenos, processá-los e apresentá-los aos linfócitos T e têm papel importante nas reações imunitárias cutâneas) e as de Merkel (essas células são mecano-receptores, embora existam evidências de que também participam do sistema neuroendócrino difuso). A espessura e a estrutura da epiderme variam de acordo com o local estudado. A pele fina apresenta uma epiderme simples e, frequentemente, estão faltando as camadas granulosa e lúcida e a camada córnea é muito reduzida. A pele mais espessa possui uma estrutura mais complexa, sendo possível observar até cinco camadas (Figura 6):

- *camada basal ou germinativa*: é a camada mais profunda da epiderme e está em contato com a derme. Apresenta intensa atividade mitótica, e juntamente com a camada espinhosa, é responsável pela constante renovação da epiderme. É constituída por dois tipos de células, as células basais e os melanócitos;

- *camada malpighiana*, também denominada *espinhosa ou corpo mucoso de Malpighi*: apresenta menor atividade mitótica em relação a camada basal. É formada por células escamosas ou espinhosas, com configuração poliédrica, achatando-se progressivamente em direção à superfície. Essas células apresentam citoplasma com curtas expansões que contêm feixes de filamentos de queratina, denominados pontes intercelulares. Esses filamentos e os desmossomos (ligações intercelulares da epiderme) têm papel importante na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito;

- *camada granulosa*: formada por células granulosas, pois em seu citoplasma há grande quantidade de grânulos de querato-hialina, e grânulos lamelares. Esses últimos se fundem com a membrana plasmática e expulsam seu conteúdo para o espaço intercelular dessa camada, onde os lipídeos se depositam. Isso contribui para a formação de uma barreira contra a invasão de microorganismos e a penetração de substâncias, tornando a pele impermeável à água e impedindo a desidratação do organismo;

- *camada lúcida*: é a camada mais evidente na pele espessa. O citoplasma das células que a compõem apresenta numerosos filamentos de queratina compactados;

- *camada córnea*: é a camada mais superficial e de espessura bastante variável, que confere proteção contra traumas físicos e químicos. É formada por células epidérmicas anucleadas com membranas celulares espessas. O citoplasma das células é repleto de filamentos de queratina encerrados em uma matriz amorfa contínua. Devido à presença da camada córnea que reveste a epiderme, a pele desempenha várias funções. Protege o organismo contra a perda de água por evaporação e

contra o atrito e as injúrias. Nas porções inferiores do estrato córneo, os filamentos de queratina associam-se à filagrina (proteína que propicia integridade estrutural à camada córnea) que por ação enzimática desprende-se da queratina e é degradada a aminoácidos que, osmoticamente, retêm água no estrato córneo. Além disso, recebe constantemente informações sobre o ambiente e as envia para o sistema nervoso central, através de suas terminações nervosas sensitivas. Por meio dos seus vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo participam da termorregulação do corpo.

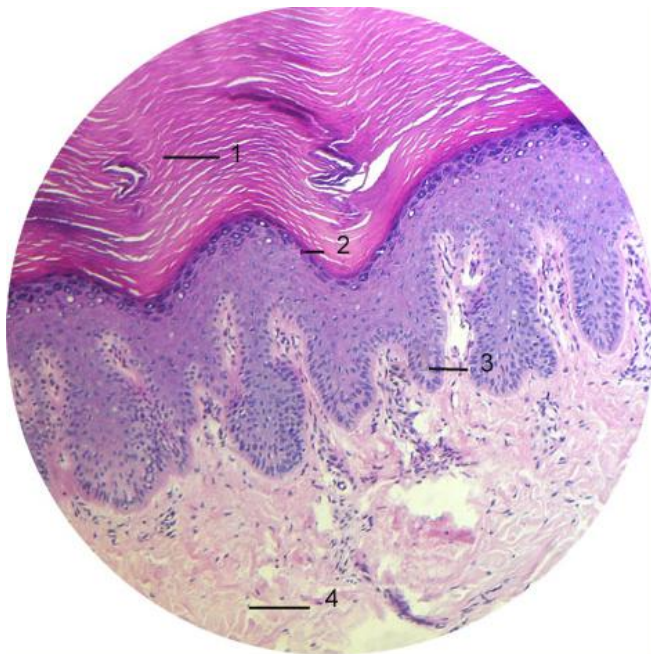


Figura 6. Fotomicrografia de corte da planta de pé humano, em que podem ser observadas as várias camadas da pele. 1: camada de queratina; 2: epiderme; 3: derme; 4: hipoderme. Coloração tricrômica. Aumento 20x (Adaptado de TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2008).

A derme é formada por tecido conjuntivo de espessura variável, rico em mucopolissacarídeos e material fibrilar de três tipos: fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares. Está firmemente apoiada à epiderme, unindo-a ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. A derme

é constituída de três camadas de limites pouco distintos: a papilar (superficial), a perianexial e a reticular (mais profunda). A camada papilar é delgada e constituída de tecido conjuntivo frouxo, o qual forma as papilas dérmicas; e fibrilas de colágeno, as quais prendem a derme à epiderme, além de proporcionar grande resistência à tensão. A camada reticular é mais espessa e constituída de tecido conjuntivo denso. Todas as camadas são responsáveis pela elasticidade e flexibilidade da pele devido à presença de fibras elásticas. Na derme são encontrados os vasos sanguíneos e os linfáticos, os nervos, os receptores especializados em determinar as sensações e estruturas derivadas da epiderme, ou seja, os anexos da pele (as glândulas sebáceas e as sudoríparas, os folículos pilosos, os pêlos e as unhas).

A substância fundamental é composta, essencialmente, por mucopolissacarídeos, dos quais os hialuronidatos e condroitinsulfatos são os mais importantes. Esse gel viscoso participa na resistência mecânica da pele às compressões e estiramentos.

Formada por tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme é a camada mais profunda da pele, que une de maneira pouco firme à derme aos órgãos subjacentes. É responsável por facilitar o deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia. Dependendo da região e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável composta exclusivamente por tecido adiposo que, quando desenvolvida, constitui o panículo adiposo. Funcionalmente, o panículo adiposo modela o corpo, participa na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos, é um depósito nutritivo de reserva de energia e proporciona proteção contra o frio, uma vez que a gordura é um bom isolante térmico.

Em resumo, a pele é um órgão de múltiplas funções devido à sua estrutura e propriedades físicas, químicas e biológicas. Confere proteção mecânica ao organismo frente à penetração de agentes externos de qualquer natureza e, ao mesmo tempo, impede perdas de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno. A presença de células imunologicamente ativas faz da derme um local com intensa atividade imunológica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

1.5.2. Histórico e aspectos gerais de cicatrização

Desde a antiguidade, o homem vem tentando intervir no processo de cicatrização de feridas. Manuscritos egípcios, datados de 3000-2500 A. C., descrevem o uso de curativos utilizando mel, graxa, fios de linho

e diversos tipos de excrementos. O Papiro de Edwin Smith, utilizado no Egito (5.000 A. C.), é conhecido como o documento cirúrgico mais antigo e se destaca por suas orientações sobre o tratamento de infecções (ZIMERMAN; VEITH, 1961). Hipócrates recomendava que as feridas fossem mantidas limpas com água morna, vinho e vinagre e secas (D'ACAMPORA et al., 2002).

Por volta da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), deu-se início ao uso de substâncias com propriedades anti-sépticas e a agentes com ação antimicrobiana, sendo que se procedia com a proteção das feridas utilizando-se curativos na forma de coberturas secas (SINCLAIR; RYAN, 1993). No início da década de 1960, houve a criação de um ambiente úmido para que fosse resolvida a ferida.

A partir de 1970, tanto nos Estados Unidos da América quanto na Europa, novos recursos surgiram e junto com eles a necessidade de se conhecer os reais benefícios de cada um. Essa preocupação fez com que os diversos órgãos e agências sanitárias passassem a coordenar estudos que pudessem estabelecer critérios para avaliar e indicar parâmetros que direcionassem uma adequada seleção para o tratamento de feridas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A palavra cicatrização define um processo em que um tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo vascularizado. Portanto, a cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que se interagem para que ocorra a repavimentação e a restauração tissular. E, ainda, diminuir os efeitos negativos que podem acometer o paciente, bem como o seu tempo de morbidade.

Clark (1993) dividiu o reparo em três fases: (1) inflamação, (2) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e (3) remodelação tissular (Figura 7).

Segundo Clark (1993), estas fases não são mutuamente excludentes, sendo sobrepostas no tempo. E envolvem componentes da matriz extracelular, células residentes, ou seja, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células nervosas. Há também a participação de leucócitos (neutrófilos, macrófagos/monócitos e linfócitos), bem como de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária e de mediadores protéicos como citocinas e fatores de crescimento. Os estágios iniciais do processo de cicatrização envolvem a síntese de colágeno, como componente principal, e de matriz extracelular. O colágeno contém, além de outros aminoácidos, quantidade substancial de hidroxiprolina

que é um marcador bioquímico utilizado para a determinação desta fibra nos tecidos (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

1.5.3. Mecanismos envolvidos no processo de cicatrização

Os danos tissulares desencadeiam uma série de eventos que resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e do sangue. Os eventos se dão através de estímulos físicos ou por sinalização química através de estruturas das células rompidas (porções da membrana celular e organelas), fragmentos dos elementos inertes dos tecidos (colágenos, elastinas, fibronectinas, e outros), proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (liberados principalmente dos grânulos das plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas) ou neo-sintetizados (eicosanóides e PAF) (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001). Essas moléculas, ao se ligarem a receptores na superfície da membrana das células locais, induzem modificações no seu metabolismo e na sua expressão gênica. Como resposta, há produção de uma segunda onda de mediadores de natureza lipídica (eicosanóides) e peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos) e a externalização de proteínas de adesão para leucócitos, nas células endoteliais na superfície da membrana voltada para a luz dos vasos.

Além disso, como decorrência do próprio trauma ou da ativação celular, o microambiente tem sua composição físico-química alterada (baixa tensão de oxigênio, diminuição de pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio) sendo esta também uma outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular. Na continuidade do processo, ocorrem no tecido lesado a infiltração de células circulantes, como neutrófilos e monócitos, e a migração de células das áreas adjacentes, como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Estas últimas, em cooperação com as células locais, anteriormente ativadas, serão as protagonistas da produção de colágeno pelos fibroblastos (fibroplasia) e deposição de matriz extracelular, formação de novos vasos (angiogênese), cicatrização e reepitelização da região da ferida (SINGER; CLARK, 1999).

Em todos os sistemas orgânicos, a resposta normal dos mamíferos à lesão ocorre em três fases distintas: inflamação, nova formação tecidual e remodelação (Figura 7). A primeira fase da cicatrização de uma ferida, a inflamação, ocorre imediatamente após o dano tecidual e os componentes da cascata de coagulação, das vias inflamatórias e do sistema imune são necessários para evitar a perda de sangue, remover o

tecido morto e desvitalizado e evitar a infecção. A hemostasia inicial ocorre através da formação de um tampão plaquetário, seguido por uma matriz de fibrina que forma uma rede e permite a infiltração de outras células. Os neutrófilos são então recrutados para a ferida em resposta à ativação do complemento, à degranulação das plaquetas e aos produtos de degradação bacteriana. Após 2-3 dias, os monócitos aparecem na ferida e se diferenciam em macrófagos. Acredita-se que os macrófagos são cruciais na coordenação dos eventos tardios em resposta à lesão.

A segunda etapa da cicatrização, ou seja, a formação de tecido novo ocorre entre 2-10 dias após a lesão e é caracterizada por proliferação celular e migração de diferentes tipos de células. O primeiro evento é a migração dos queratinócitos para a derme. Em seguida, há formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Esses novos capilares associados aos fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina com tecido de granulação, formando um novo substrato para migração de queratinócitos na fase tardia do processo de reparo da lesão. Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o fator A de crescimento do endotélio vascular (VEGFA) e o fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF2 ou bFGF). A angiogênese também pode acontecer a partir do recrutamento de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea, embora a magnitude desta contribuição seja pequena. Ao final dessa etapa, os fibroblastos que são atraídos a partir da borda da lesão ou da medula óssea são estimulados pelos macrófagos, e alguns se diferenciam em miofibroblastos. Miofibroblastos são células contráteis que, ao longo do tempo, aproximam as bordas da lesão. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, o que constitui um tecido cicatricial com certo grau de maturidade.

Além disso, mais de 6-12 meses são necessários para que a matriz extracelular esteja ativamente remodelada, principalmente a partir de um molde de colágeno tipo III para um composto predominantemente de colágeno tipo I. Esse processo é realizado pelas metaloproteinases de matriz secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e reforça a reparação tecidual. No entanto, o tecido cicatricial não recupera as propriedades de um tecido que nunca foi lesado.

O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas. Além da atividade imunológica, os leucócitos estão intimamente envolvidos com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como com as reações anabólicas de

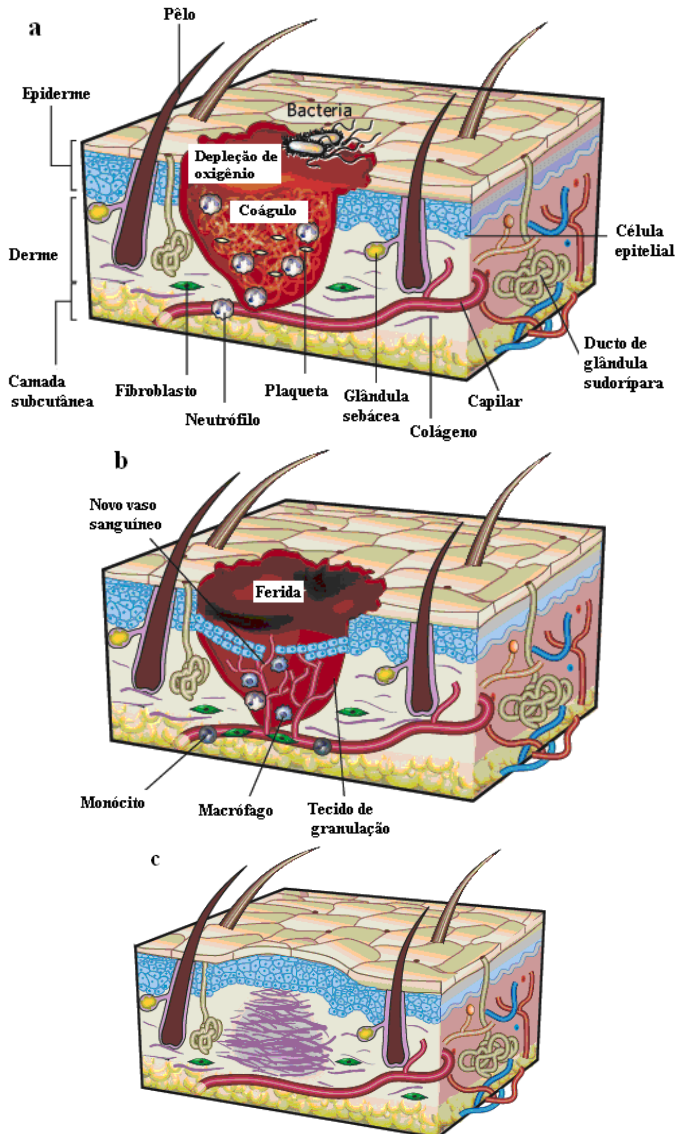


Figura 7. Fases do reparo de uma lesão na pele: **a.** Inflamação: duração de até 48 horas. **b.** Formação de tecido novo: ocorre cerca de 2-10 dias após a lesão **c.** Remodelação: duração de um ano ou mais. (Adaptado de GURTNER et al., 2008).

formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento (RICHER, 1996), responsáveis pela recomposição tecidual ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A terceira etapa da cicatrização é a remodelação tissular. Esse processo se inicia 2-3 semanas após a lesão e tem duração de um ano ou mais. Durante essa etapa, todos os processos ativados após a lesão são gradualmente diminuídos e cessam. A maioria das células endoteliais, os macrófagos e os miofibroblastos sofrem apoptose ou saem da ferida, deixando uma massa que contém poucas células e consiste principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular. Interações epitélio-mesenquimais continuamente regulam a integridade e a homeostase da pele.

1.6. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes na cicatrização de lesões

A literatura pertinente evidencia o envolvimento de radicais livres em processos tanto fisiológicos quanto patológicos como a artrite reumatóide, fibrose cística, cardiomiopatia, AIDS, câncer e nas patologias e lesões desenvolvidas na pele causadas, principalmente, por traumas e queimaduras. Sugere-se que em todas essas patologias a produção excessiva e o envolvimento de espécies reativas acompanham um prejuízo tecidual onde estão sendo geradas. Todavia, é sabido que a injúria a um tecido leva ao estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Dessa forma, existe uma considerável preocupação quanto ao desenvolvimento de novos mecanismos na tentativa de prevenir e/ou tratar os possíveis danos que essas espécies químicas venham a causar à saúde humana.

As EROs são produzidas por todas as células durante os processos metabólicos de um organismo, por exemplo, na cadeia respiratória. Grande quantidade de EROs são produzidas em tecido lesionado e inflamado pela NADPH oxidase, um complexo enzimático, que é expresso em níveis elevados em particular nas células inflamatórias. Este fenômeno tem sido descrito como o "burst respiratório". Após a ativação da NADPH oxidase, as células produzem o ânion superóxido, um radical livre altamente reativo. Este radical é rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água, um processo facilitado pela enzima SOD. Embora o H_2O_2 não seja um radical, este pode causar dano celular grave devido à geração de radical hidroxila na presença de íons ferro ou de íons cobre (reação de Fenton).

O radical hidroxila é altamente agressivo, resultando na oxidação de macromoléculas celulares. Portanto, o H_2O_2 deve ser rapidamente detoxificado. É o que fazem as enzimas CAT, várias GPx e peroxirredoxinas, essas últimas são também capazes de detoxificar lipoperóxidos. Além das enzimas, existe uma grande variedade de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular exógenas e endógenas capazes de neutralizar as EROs. Se a detoxificação/neutralização de EROs é insuficiente ou se as EROs são produzidas em excesso, ocorre o estresse oxidativo, que nada mais é que uma situação de desequilíbrio entre a quantidade de radicais livres e de defesas antioxidantes. Essa situação de desequilíbrio provoca danos celulares graves.

O papel dos antioxidantes na remoção de produtos da inflamação já é conhecido e, além disso, estes compostos também são benéficos na cicatrização de lesões por outras razões. Antioxidantes atuam contra o excesso de proteases e EROs, muitas vezes formadas pelo acúmulo de neutrófilos no leito da lesão, e protegem os inibidores de protease do dano oxidativo. As substâncias antioxidantes podem evitar a destruição de fibroblastos e outras células provocada pelo excesso de EROs, e por isso, podem ser importantes no sucesso do tratamento de lesões (HOUGHTON et al., 2005).

1.6.1. Radicais livres

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons. Em meio biológico, a maioria das moléculas permanece com os elétrons pareados e, portanto, não se encontra na forma de radicais. Todavia, em determinadas situações os RL, também denominados espécies reativas, são formados podendo assim desencadear um efeito fisiológico e/ou patológico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

“Espécies reativas” é um termo coletivo que engloba as espécies reativas de oxigênio (EROs) entre outras, como, por exemplo, de nitrogênio (ERNs) (Tabela 1). “Reativo” não é sempre um termo apropriado, uma vez que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o óxido nítrico (NO) reagem diretamente com poucas moléculas no corpo humano, enquanto que o radical hidroxil ($\cdot OH$) pode reagir com qualquer molécula (HALLIWELL, 2000).

1.6.2. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

O metabolismo do oxigênio, embora essencial para os organismos aeróbios, impõe uma ameaça potencial para as células devido à contínua formação de espécies parcialmente reduzidas de oxigênio, ou seja, as EROs formadas pelas chamadas reações de iniciação (FRIDOVICH, 1986). Todavia, o oxigênio apresenta importância relevante por ser responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas no sistema biológico, o que caracteriza seu papel biológico e clínico. Posteriormente, ficou evidente que esta toxicidade é um fenômeno contínuo e presente nos estados de normóxia em organismos aeróbios saudáveis (WILHELM FILHO; GONZÁLEZ-FLECHA; BOVERIS, 1994).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas formas de radicais e não radicais. (Adaptada de HALLIWELL, 2000).

| Espécies reativas de oxigênio | |
|--|-------------------------------------|
| Radicais | Não radicais |
| Superóxido ($O_2^{\cdot -}$) | Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) |
| Hidroxil ($\cdot OH$) | Ácido hipocloroso ($HOCl$) |
| Peroxil (RO_2^{\cdot}) | Ácido hipobromoso ($HOBr$) |
| Alcoxil (RO^{\cdot}) | Ozônio (O_3) |
| Hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) | Oxigênio singlete (1O_2) |
| Espécies reativas de nitrogênio | |
| Radicais | Não radicais |
| Óxido nítrico ($\cdot NO$) | Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) |
| Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) | Alquil peroxinitrito ($ROONO$) |

Entre a maioria dos eucariontes, o oxigênio tem a função de servir como último aceptor de elétrons na respiração mitocondrial, quando finalmente é reduzido à água durante o complexo processo de fosforilação oxidativa. Assim, em torno de 98% do oxigênio consumido nesses organismos aeróbios é reduzido de forma tetravalente até água (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979) através de reações enzimáticas na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. No entanto, cerca de 2% escapa desta redução bivalente e liga-se de forma monovalente, levando à formação de EROs (Figuras 8 e 9).

As EROs são formadas através da redução parcial do oxigênio até água, através de sucessivas reações (figura 8). A transferência de um

elétron para o oxigênio produz o primeiro intermediário reativo, o $O_2^{\bullet-}$, o qual sofre a ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) ou dismutação espontânea a H_2O_2 , que não é um RL. O H_2O_2 sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de oxigênio (O_2) formando o $\bullet OH$, catalisada por metais de transição - pelos sistemas Fe^{+2}/Fe^{+3} (reação de Fenton) ou Cu^{+2}/Cu^{+3} , ou pela combinação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss) (Figura 9) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A geração de $\bullet OH$ em sistemas biologicamente relevantes, a partir da Reação de Haber-Weiss (reação do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2) ou da Reação de Fenton (Figura 9) tem grande significado biológico (PRYOR, 1986; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999) devido à sua elevada reatividade, apesar de estar presente em concentrações intracelulares extremamente baixas (10^{-18} M) e apresentar reduzidíssimo tempo de meia-vida (10^{-9} s) (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). Isso faz com que o $\bullet OH$ reaja muito rapidamente com quase todos os tipos de moléculas, como os açúcares, os aminoácidos, os fosfolipídeos e as bases púricas e pirimídicas de DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), proporcionando as reações de propagação envolvendo a peroxidação lipídica nas membranas celulares, além das reações de carbonilação de proteínas e dano ao DNA.

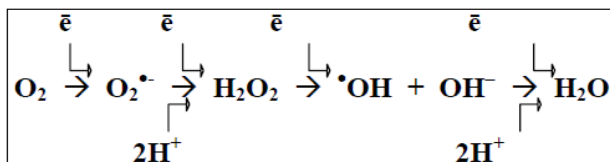


Figura 8. Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio à água (Adaptado de NORDBERG; ARNER, 2001).

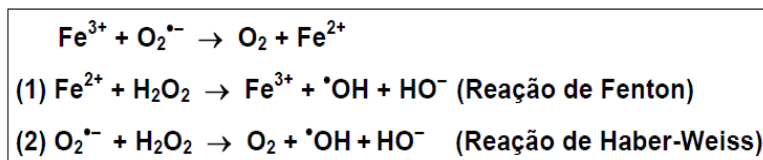


Figura 9. Reações de formação do radical hidroxil ($\bullet OH$) (Adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Existem também outros mecanismos de geração das EROs em sistemas biológicos: o sistema de β -oxidação peroxissomal, as reações do citocromo P450 e a geração de $\cdot\text{NO}$ e HOCl no processo fagocítico (BECKMAN; AMES, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Outras enzimas que produzem $\text{O}_2^{\cdot-}$ são lipoxigenases, ciclooxigenases (BOVERIS; CADENAS, 1982), além da oxidação de diversas moléculas como a adrenalina, vários aminoácidos, heme proteínas e metais de transição (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Concomitantemente, há várias enzimas oxidases e oxigenases geradoras de EROs. A mieloperoxidase (MPO) (KETTLE; WINTERBOURN, 1997) e a NADPH-oxidase (produzida na membrana dos fagócitos) são dois exemplos característicos que agem reduzindo o oxigênio molecular a $\text{O}_2^{\cdot-}$ (CROSS; YARCHOVER; CURNUTTE, 1994).

Nas últimas décadas, evidenciou-se também a contribuição deletéria de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) nos sistemas biológicos pela ação do monóxido de nitrogênio ou NO . Isso ocorre, principalmente, através da combinação do NO com o $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando o peroxinitrito (ONOO^-). O ONOO^- mesmo não sendo um radical, é uma forma muito difusível e reativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além disso, o ONOO^- é um importante mediador da peroxidação lipídica, incluindo a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), a nitração de proteínas, a desaminação das bases de DNA (ROMERO; DENICOLA; RADI, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O $\cdot\text{NO}$ pode converter-se em outras ERNs, tais como cátion nitroso (NO^+), ânion nitroxil (NO^-) ou ONOO^- (GOW; STAMLER, 1998). O $\cdot\text{NO}$ está envolvido em múltiplos efeitos fisiológicos importantes no organismo humano, tais como relaxamento da musculatura lisa vascular, regulação da pressão arterial, microbicida junto a macrófagos, fator importante na agregação plaquetária, no balanço entre crescimento e diferenciação das células vasculares da musculatura lisa, e outras funções GMPc-dependentes (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003). Um dos papéis importantes do $\cdot\text{NO}$, junto com outras espécies reativas ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HClO^\cdot), é a destruição de patógenos por ativação das células fagocíticas, conhecida como “*respiratory burst*” (KEHER, 1993; DRÖGE, 2002).

1.6.3. Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante que pode causar

uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (SIES, 1985; CROFT, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O estresse oxidativo pode ocorrer tanto pelo aumento de espécies pró-oxidantes (EROs) e sem o concomitante aumento das defesas antioxidantes, como pela diminuição das defesas sem o aumento das EROs. E, ainda, pelo aumento da concentração de EROs paralelamente a uma diminuição das defesas antioxidantes (SIES, 1985).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de glutathione oxidada (GSSG) e depleção de glutathione reduzida (GSH). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras do grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções.

Nas proteínas, as EROs podem reagir diretamente com as mesmas ou podem reagir com moléculas como lipídios e carboidratos, gerando produtos que podem reagir com as proteínas. Tanto a ligação peptídica quanto as cadeias laterais podem ser o alvo do ataque de EROs (LEVINE et al., 1990; MARNETT, 2000). Esse dano oxidativo às proteínas tem grande importância em organismos vivos, uma vez que pode causar dano em receptores, em enzimas, interferência na via de transdução de sinal, alteração no transporte de proteínas e enzimas que mantêm os níveis intracelulares adequados de íons cálcio (Ca^{+2}) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; GATÉ; PAUL; NGUYEN, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Modificações de enzimas e proteínas podem ter papel importante na etiologia de doenças, como na artrite reumatóide e escleroderma (PENG, 1997) e ainda aterosclerose, isquemia-reperfusão e aquelas associadas com o envelhecimento (GATÉ; PAUL; NGUYEN, 1999).

A peroxidação lipídica é provavelmente a maior consequência da ação deletéria das EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os ácidos graxos poliinsaturados são excelente alvos para o ataque das EROs por causa de suas múltiplas duplas ligações (SIES, 1985; NORDBERG; ARNÉR, 2001). As consequências mais comuns da peroxidação lipídica correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas, incluindo o processo de transporte transmembrana, a transdução de sinais mediada por receptores, e a

preservação do gradiente de íons e metabólitos. E de forma secundária, pode causar dano ao DNA e a proteínas.

Os efeitos mutagênicos das EROs são derivados da modificação estrutural na molécula de DNA. As alterações são inúmeras (quebra de fita, oxidação de purinas com formação de 8-oxoguanina, união DNA-proteínas indesejáveis, entre outras), especialmente devido ao radical hidroxil. Embora exista um sistema de reparo que rapidamente corrige o DNA (NORDBERG; ARNÉR, 2001), o nível de dano pode exceder a capacidade de reparo celular (GATÉ; PAUL; NGUYEN, 1999). Sendo assim, haverá uma série de mutações durante a replicação. Este mecanismo poderia, parcialmente, explicar porque indivíduos cronicamente expostos ao estresse oxidativo têm alta prevalência de câncer (GATÉ; PAUL; NGUYEN, 1999; NIJVELDT et al., 2001).

As EROs são produtos biológicos do metabolismo celular que em concentrações relativamente baixas podem atuar como segundos mensageiros, reguladores de genes e mediadores da ativação celular (DRÖGE, 2002; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003; POLLA; POLLA; POLLA, 2003). Entretanto, em estado de estresse oxidativo ou em altas concentrações, as EROs podem causar danos irreparáveis, mutagênese e carcinogênese, e têm envolvimento em, pelo menos, mais de duas centenas de processos patológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001; GRIENDLING; FITZGERALD, 2003).

1.6.4. Defesas antioxidantes

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio. Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante, que na sua maioria encontram-se no meio intracelular.

No intuito de minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das EROs, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos, como enzima superóxido dismutase (SOD), enzima catalase (CAT) e enzima glutathione peroxidase (GPx); ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e glutathione

reduzida (GSH) (Figura 10) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VALKO et al., 2007).

Os principais sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas celulares são compostos pela SOD, CAT e GPx, que constituem a primeira defesa endógena de neutralização dos radicais livres (Figura 10). Secundariamente, a glutatona redutase (GR) e a glutatona S-transferase (GST) auxiliam na regeneração da GSH e na conjugação de metabólitos reativos (Figura 10). Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do $O_2^{\cdot -}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do $^{\cdot}OH$, que embora tenha um tempo de meia vida curta, na fração de segundos, e em reduzida concentração, é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS; CADENAS, 1997).

Os antioxidantes não enzimáticos são qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Além dos antioxidantes clássicos, presentes em concentrações relativamente baixas, existem compostos que possuem pequena atividade antioxidante. Porém, quando presentes em altas concentrações, esses compostos podem contribuir com a capacidade antioxidante total (DRÖGE, 2002). As células contêm antioxidantes não enzimáticos que incluem compostos endógenos, como a GSH e a bilirrubina, e outros exógenos como a vitamina E, C e A (além de outros carotenóides como o licopeno e o β -caroteno), flavonóides, compostos fenólicos e outras pequenas moléculas derivadas de fonte vegetais (SCANDALIOS, 1997).

O tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, conhecido como GSH, é o principal tiol intracelular não protéico em células eucariotas. A GSH desempenha um importante papel em muitos tipos de reações de biorredução e conjugação, como: integridade do citoesqueleto, síntese de proteína, síntese de DNA e de algumas prostaglandinas, transporte de aminoácidos, capacidade de captar ou sequestrar radicais livres e eliminar os produtos da lipoperoxidação, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente tóxicos (STEBBENS, 2004). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente no resíduo de cisteína. Por isso, a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta.

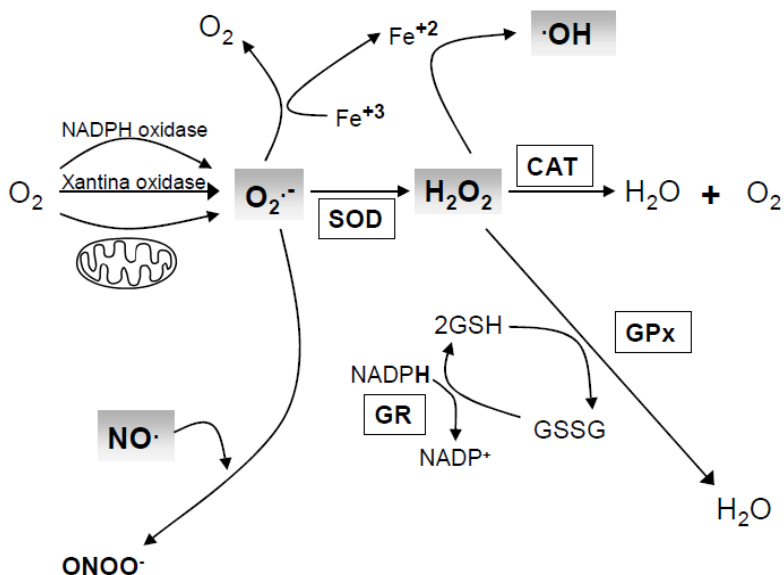


Figura 10. Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de espécies reativas. (Adaptado de GRIENDLING; FITZGERALD, 2003).

Esse tripeptídeo atua como transportadora e reservatório da cisteína e pode prover proteção contra todas as formas de estresse oxidativo, através de pelo menos dois mecanismos: 1) nos primeiros momentos do dano oxidativo, GSH pode agir bloqueando o potencial tóxico das EROs; 2) pode também ajudar a ativar muitos genes que têm função de extinguir o dano oxidativo (NEBERT; AMY; MATTEW, 2000; STEHBENS, 2004).

1.7. O câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças, diretamente relacionadas a mutações no DNA de células somáticas, que têm em comum uma proliferação celular descontrolada e que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2009). Em geral, a progressão dos tumores segue uma seqüência evolutiva: crescimento local, metástase em linfonôdos regionais e para outros órgãos e óbito (ALISSON, 2002). O câncer é, portanto, uma

enfermidade de caráter genético, que se produz ao serem eliminadas as restrições que limitam a divisão celular em células de tecidos já diferenciados. Envolve a expressão de oncogenes celulares, de promotores de crescimento e a inativação de genes supressores tumorais. Além disso, ocorre perda do controle do mecanismo de morte celular por apoptose (MOFFAT et al., 2000).

Para que um tumor seja classificado como maligno ou neoplasia, seu crescimento precisa ser desordenado além de ser necessariamente capaz de invadir tecidos vizinhos ou se espalhar para sítios distantes (metástase). Já um tumor benigno é simplesmente uma massa de células localizadas que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2009).

O processo de carcinogênese, em geral, se dá lentamente. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor: 1) estágio de iniciação: as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos. Nessa fase, as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Encontram-se "iniciadas" para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio; 2) estágio de promoção: as células geneticamente alteradas, ou seja, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio; 3) estágio de progressão: caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2009).

A maior parte dos tipos celulares carrega em si um genoma completo que corresponde a informações que dão à célula a habilidade de crescer e se dividir, mesmo depois do organismo já desenvolvido. Isso garante a manutenção do tecido adulto ao longo da vida do indivíduo e inclui o reparo de lesões assim como a reposição de células que sofrem desgaste devido à sua atividade por um longo período (WEINBERG, 1995).

1.7.1. Estimativas

A incidência média de câncer é de aproximadamente 10 milhões, com 6 milhões de mortes por ano (WHO, 2009). Estima-se, ainda, que existirão cerca de 15 milhões de novos casos até 2020.

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nessas localidades.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2009).

O câncer é uma doença multifatorial, mas o envelhecimento da população e a maior exposição a fatores de risco aumentam a sua incidência, configurando-o como um problema de saúde pública, tanto de dimensões internacionais como nacionais.

1.7.2. Tratamento

Os progressos da bioquímica e biologia molecular contribuíram de forma efetiva esclarecendo aspectos relacionados à patogenia do câncer, permitindo o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Entretanto, como o câncer é uma família de doenças, cada tipo de câncer tem sua evolução clínica característica e, conseqüentemente, terapia diferenciada (GORCZYCA; GONG; ARDELT, 1999).

Atualmente, existem diversas formas de tratamento do câncer que vão depender do estágio no qual o tumor se encontra (ACS, 2006). Entre eles podem ser citados: (1) intervenção cirúrgica que tem como objetivo a eliminação da massa tumoral; (2) quimioterapia que utiliza medicamentos para destruir as células que formam o tumor (atua interferindo na mitose celular, impedindo dessa forma, que a célula se prolifere com rapidez); (3) radioterapia que utiliza radiações (raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X e até prótons e mésons pi negativo) para destruir o tumor ou impedir que as células aumentem (ALMEIDA et al., 2005). Essas três formas de tratamento podem ser

utilizadas em conjunto ou de forma isolada, porém, centros especializados em terapia do câncer apresentaram evidências de que terapias combinadas podem melhorar enormemente o prognóstico de sobrevida do paciente (INCA, 2009; ACS, 2006).

É passível de consideração o sucesso da quimioterapia que depende da maior sensibilidade das células neoplásicas ao tratamento do que das células normais, uma vez que células em proliferação são em geral mais susceptíveis do que as células quiescentes. Os quimioterápicos ideais devem erradicar as células cancerosas sem prejudicar os tecidos normais.

Historicamente, há evidências da utilização de agentes quimioterápicos sob a forma de sais metálicos à base de arsênio, cobre e chumbo em civilizações antigas do Egito e da Grécia. Porém, a partir da década de 50, com a identificação dos primeiros antibióticos antitumorais, houve um rápido desenvolvimento da quimioterapia antitumoral. Nas décadas seguintes, houve o descobrimento de diversos fármacos importantes (BONASSA, 2001).

O sucesso no tratamento dos tumores por meio de fármacos depende da maior sensibilidade ao tratamento das células neoplásicas, comparativamente às células normais, uma vez que células em proliferação são, em geral, mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes. Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre células neoplásicas e normais são, às vezes, pequenas, e a toxicidade é um problema comum (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996).

Embora já existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhuma das abordagens terapêuticas foi capaz de regredir completamente as diferentes manifestações desta doença. Por isso, o interesse pelos medicamentos desenvolvidos a partir das plantas medicinais tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Na busca de fármacos tão ou mais eficazes do que os quimioterápicos tradicionais usados no tratamento do câncer, porém com menos efeitos tóxicos e com menor probabilidade de multiresistência (KATSUNG, 1999). Portanto, a pesquisa de compostos com atividade antitumoral é de extrema importância tanto na perspectiva de proposição de novas moléculas protótipo de antineoplásicos.

Dentro deste contexto, no presente trabalho além da avaliação da atividade cicatrizante da *Musa spp* foi estudado o efeito antitumoral desta planta uma vez que existem relatos do uso popular dessa planta para o tratamento do câncer.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Com base nos antecedentes acima apresentados, este trabalho teve por objetivo geral avaliar as atividades cicatrizante e antitumoral (citotóxica e/ou antiproliferativa) de extratos provenientes da casca de *Musa* spp. obtidos por extração convencional e extração supercrítica.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Caracterização química dos extratos bruto aquoso (EBAQ), bruto hidroetanólico (EBHE) e derivado de extração supercrítica (ESC) provenientes das cascas de banana *Musa* spp.;

2.2.2. Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo* dos extratos (EBAQ, EBHE e derivado de ESC) das cascas de banana *Musa* spp.;

2.2.3. Avaliação do estresse oxidativo *ex vivo* em modelo animal de camundongo isogênico Balb/C tratados com os extratos (EBAQ e EBHE) das cascas de banana *Musa* spp.;

2.2.4. Avaliação do aspecto histológico da lesão ao longo do processo de cicatrização dos camundongos tratados com EBAQ das cascas de banana *Musa* spp.;

2.2.5. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos (EBAQ, EBHE e derivado de ESC) das cascas de banana *Musa* spp.;

2.2.6. Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* dos extratos (EBAQ e derivado de ESC) das cascas de banana *Musa* spp.

3. Materiais

Os experimentos de extração a partir da casca de banana *Musa* spp. foram desenvolvidos no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os ensaios de atividade cicatrizante e antitumoral foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade.

Os estudos de morfologia microscópica foram realizados no Laboratório de Marcadores Histocitológicos do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética também dessa Universidade.

3.1. Matéria-prima e produção de extratos

3.1.1. Identificação botânica da matéria-prima

A identificação botânica da matéria-prima empregada na produção dos extratos, as cascas de banana, e objeto de estudo deste trabalho foi realizada pelo engenheiro agrônomo Márcio Sonego, Pesquisador em Agrometeorologia e Fruticultura Tropical da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) - Estação Experimental de Urussanga/SC. As características da folha, da flor e do fruto da bananeira foram analisadas e comparadas tendo como base a coleção de cultivares de bananeira *Musa* spp. dessa estação experimental, assim como a literatura proposta por Dallos (2003).

A banana, utilizada para a obtenção dos extratos (EBAQ: extrato bruto aquoso, EBHE: extrato bruto hidroetanólico e ESC: extrato derivado da extração supercrítica) aplicados neste trabalho, tem origem no município de Jacinto Machado, localizado no extremo sul catarinense, e seus arredores. Nessa região, o mais comum é processar a banana branca, pois essa possui maior teor de matéria seca em relação à banana caturra. Tanto a banana caturra, quanto a banana branca têm origem a partir de cruzamentos das espécies *M. acuminata* e *M. balbisiana*. A haploidia da espécie *M. acuminata* recebe a letra A e a *M. balbisiana* a letra B. Então, não existe uma espécie diferente de banana, e sim o arranjo da ploidia. Desta forma, por exemplo, teremos:

- grupo AAA (triplóide): são as cultivares do tipo Cavendish, tais como a Nanica, Nanicão, Grande Naine, também conhecidas como Caturra ou Banana D'água;

- grupo AAB (triplóide): são as cultivares do grupo Prata, tais como a Branca, Enxerto, Catarina, Maçã. Na literatura mundial, a banana Enxerto ou Prata Anã também é escrita da seguinte maneira: *M. acuminata* x *balbisiana* Colla (AAB Group) cv. Pome. O termo Pome é referido no Brasil como Prata;

- grupo ABB (triplóide): é a cultivar banana figo. Quanto mais características de *M. balbisiana*, mais amilácea é a fruta.

Diz-se que 80% da produção comercial de bananas no mundo pertence ao grupo AAA (grupo Cavendish). A cultivar Enxerto é a

bananeira mais plantada no litoral sul do estado de Santa Catarina, com cerca de 6.000 hectares. Pelo Brasil afora, essa cultivar recebe outros nomes, tais como: Enxerto, Prata de Santa Catarina, Branca Baixa, Prata Anã, Catarina, Branca de Jacinto Machado e Prata Mineira. Já na Austrália, é conhecida como Santa Catarina Prata e Lady's Finger e nas ilhas Cook, é chamada de Ice Cream (LICHTENBERG; MOREIRA, 2004).

Assim, a banana empregada nos extratos aplicados a nesse trabalho é denominada Musa spp, subgrupo Prata, grupo genômico AAB, cultivar Prata Anã.

3.1.2. Preparação da matéria-prima

As cascas de banana (Musa spp.) foram fornecidas por uma empresa de processamento de bananas, no município de Jacinto Machado/SC.

Antes da extração por maceração hidroetanólica, as cascas de banana foram submetidas a um pré-tratamento que compreendeu o processo de liofilização da matéria-prima. As cascas de banana foram picadas em fatias e congeladas por 6 horas. Após serem congeladas, as cascas de banana foram submetidas à liofilização em liofilizador de escala experimental (LD 3000, Terroni) no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por 14 horas. As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno junto com saches de sílica e armazenadas em freezer doméstico. Antes de serem utilizadas para procedimento de extração, as cascas liofilizadas foram trituradas em liquidificador obtendo-se um pó fino.

3.1.3. Produção de extratos

3.1.3.1. Extrações convencionais utilizando solventes orgânicos

3.1.3.1.1. Extração aquosa

Para a extração aquosa e obtenção do EBAQ, 300 gramas de casca de banana *in natura* foram adicionados em 900 mL de água destilada fervente. Após 5 minutos de cozimento, em banho-maria, a casca *in natura* foi triturada no liquidificador e cozida em banho maria por duas horas a 90°C. Os extratos obtidos foram filtrados por gravimetria e acondicionados em frascos âmbar para então serem liofilizados em liofilizador de escala experimental e armazenados em

freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem realizados os ensaios para avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral.

3.1.3.1.2. Maceração hidroetanólica

A extração com solvente orgânico foi realizada através do método de maceração para obtenção do EBHE. Nesses experimentos, utilizou-se como solvente o etanol P.A. em solução hidroalcoólica (etanol - água destilada na proporção 2:3, v/v), caracterizando as tinturas caseiras. O processo de maceração foi realizado em duplicata, segundo o procedimento descrito por Cunha et al. (2004). As macerações foram realizadas na proporção de 1:10 de casca de banana liofilizada em base seca e solvente. A massa de casca de banana previamente calculada considerando-se a umidade da amostra de casca de banana *in natura* foi depositada em um balão de fundo chato e foi adicionado 640 mL de solvente. A mistura de casca de banana e solvente foi mantida ao abrigo da luz por um período de 5 dias, na temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. A separação da amostra e extrato foi realizada através de filtração por gravidade a temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. O extrato bruto hidroetanólico obtido foi mantido em refrigerador doméstico a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser realizada a evaporação dos solventes.

Para a evaporação dos solventes foi realizada em um rota-evaporador, sob vácuo de -650 mmHg e rotação de 50 rpm. O extrato seco foi pesado em balança analítica, os resultados de rendimento foram expressos em base seca e base úmida como $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$. Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar, liofilizados em liofilizador de escala experimental e armazenados em freezer doméstico a -18°C até serem realizados os ensaios para avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral.

3.1.3.2. Extração supercrítica com CO_2 puro

Como processo alternativo de extração destaca-se a tecnologia supercrítica, que emprega gases densos como solventes de extração, em operações a alta pressão.

Um fluido submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico torna-se supercrítico. Várias propriedades dos fluidos são alteradas sob essas condições. A densidade do fluido supercrítico é similar a dos líquidos, sua viscosidade assemelha-se a dos gases e sua capacidade de difusão é intermediária entre os dois estados. Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006). Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de

difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem se difundir facilmente através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações (DEL VALLE; AGUILLERA, 1999; RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente supercrítico mais empregado no processo de extração por ESC que, por sua natureza apolar, dissolve preferencialmente compostos apolares. Substâncias de alta polaridade também podem ser extraídas com CO₂ supercrítico em altas densidades (altas pressões de operação) e/ou mediante o emprego de co-solventes, como o etanol e o metanol, com os quais é possível aumentar o espectro de substâncias solúveis ao CO₂. Estes co-solventes, normalmente solventes orgânicos, são misturados ao CO₂ em baixas concentrações para aumentar o rendimento de processo e a seletividade dos extratos (PASQUEL et al., 2000; POKORNY; KORCZAC, 2001).

Assim, para atender aos objetivos deste trabalho de extração de compostos bioativos de casca de banana *Musa spp.*, o LATESC da UFSC dispõe dos equipamentos necessários para a preparação da matéria-prima, para as extrações convencionais, além de duas unidades de extração a alta pressão.

Os experimentos de extração supercrítica para obtenção do ESC foram realizados empregando-se o método dinâmico de extração que se caracteriza pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida. O extrator supercrítico utilizado opera a uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,67 g/min a 13,33 g/min. A unidade de extração supercrítica disponível no LATESC foi completamente desenvolvida e construída pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha.

3.2. Animais

Antes de se iniciar a execução deste trabalho, o mesmo foi submetido ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado pelo mesmo sob o número de protocolo PP00353.

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos de linhagem isogênica Balb/C (*Mus musculus*), machos (20±2 g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do LABIOEX.

Os animais foram mantidos conforme recomendações de *Guidelines* reconhecidos internacionalmente e destinados para a criação e o manejo de animais para a pesquisa. Assim, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura 25 ± 2 °C e 60 % de umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum* para adaptação.

3.3. Manutenção do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

A manutenção do tumor ascítico de Ehrlich *in vivo* foi realizada através da inoculação das células do TAE a uma concentração de 5×10^6 células por animal, através da aplicação de 0,2 mL de uma suspensão das células em salina, na cavidade abdominal do animal previamente anestesiado (solução de cetamina e xilazina).

A cada nove dias, os camundongos receptores - de linhagem isogênica Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g de peso), com aproximadamente 60 dias, - obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do LABIOEX - receberam as células do TAE na cavidade abdominal.

4. Metodologia

4.1. Determinação de galocatequina em extratos de casca de banana *Musa spp* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise de galocatequina nos produtos derivados de extrações convencionais e supercrítica considerou a injeção de uma alíquota de 10 µL de amostra (1mg de extrato/mL) em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C18 (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm Ø) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 280 nm.

A eluição utilizada consistiu de H₂O:AcOH:η-BuOH (350:1:10, v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min e a identificação do composto de interesse foi feita com base no tempo de retenção obtidos a partir da análise de amostra padrão galocatequina > 98 %, Sigma G6657.

A quantificação do composto alvo utilizou uma curva padrão externa ($200 \mu\text{g/mL} - 2,5 \mu\text{g/mL}$; $y = b.x$), tomando como base a área do sinal de galocatequina. Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra, a partir de análises realizadas em triplicata.

4.2. Atividade cicatrizante

4.2.1. Animais e tratamento

Primeiramente, os camundongos isogênicos Balb/C foram submetidos a um procedimento anestésico através da administração de uma solução contendo 15 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear, assepsia do local com álcool 70 % e delimitação da área de 1 cm². Posteriormente, foi realizada a excisão de 1 cm² de tecido epitelial dorsal utilizando-se um bisturi de lâmina dezenove (OLIVEIRA et al., 2000). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e sem maravalha. A maravalha foi substituída por folhas de papel toalha, no intuito de não interferir no processo cicatricial, evitando o contato com a área da lesão e possível contaminação. Também foi realizada limpeza diária das gaiolas na tentativa de manter um ambiente limpo e adequado durante o período experimental.

Estando os camundongos devidamente acondicionados, esses foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=30, por grupo). O grupo I, correspondente ao grupo controle positivo, foi subdividido em outros cinco grupos (n=6, por grupo) que receberam aplicação tópica de solução de alantoína (50 mg/kg/dia) durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias, respectivamente, com início imediatamente após o procedimento cirúrgico. A aplicação tópica da solução de tratamento, tanto de alantoína quanto dos extratos de casca de banana, deu-se através da pipetagem de 100 µL deste conteúdo, correspondendo a dose de 50 mg/kg/dia e suficiente para cobrir a área da lesão inicial de 1 cm². O grupo II ou grupo controle negativo foi subdividido em cinco grupos (n=6, por grupo) e os animais pertencentes a esse grupo receberam somente aplicação tópica do veículo utilizado para diluir os extratos de *Musa spp.*, conforme descrito anteriormente para o grupo controle positivo. Os grupos III e IV correspondem aos grupos testes de animais tratados com extrato bruto hidroetanólico e extrato bruto aquoso de *Musa spp.*, respectivamente. Os camundongos dos grupos III e IV (n=30, cada grupo), foram subdivididos em cinco grupos (n=6, por grupo), receberam diariamente uma aplicação tópica de extrato bruto hidroetanólico (50mg/kg/dia) e extrato bruto aquoso (50mg/kg/dia) durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias, respectivamente, com início imediatamente após o procedimento cirúrgico. Todos os animais receberam tratamento pós-operatório com solução de paracetamol (110 mg/kg), por via oral,

após vinte e quatro horas do procedimento cirúrgico, duas vezes ao dia e durante todo o período experimental. A cada três dias de tratamento, num período total de 15 dias, foi coletado o tecido cicatricial dos animais e foram analisados os parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato.

4.2.2. Parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato

4.2.2.1. Morfometria da lesão

Esse parâmetro inclui a porcentagem de redução da lesão (comparação da área lesionada no dia do procedimento cirúrgico e a área cicatrizada a cada três dias, através de fotografia da ferida), o período de epitelização e o peso do granuloma. Para determinar a porcentagem de redução da lesão, as feridas foram fotografadas (Câmera Digital Kodak Easy Share CX7430), com distância padronizada, imediatamente após a cirurgia para retirada de tecido epitelial e em intervalos de três dias, até a cicatrização total da lesão (OLIVEIRA et al., 2000). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software Mocha 1.2, a partir das fotografias obtidas. A porcentagem de redução da lesão (%) foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $\% = [(\text{área cicatrizada}) \times 100] / \text{área da lesão realizada no procedimento cirúrgico}$. As feridas no dorso dos animais foram observadas diariamente, após o procedimento cirúrgico, para a determinação do período de epitelização. Esse período corresponde ao número de dias necessários para a completa cicatrização da lesão, ou seja, ausência de indícios do processo cicatricial. A pesagem dos granulomas foi realizada após cada coleta desse tecido cicatricial (amostra de 1 cm²), ou seja, a cada três dias após o procedimento cirúrgico (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

4.2.2.2. Conteúdo de hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um marcador bioquímico da cicatrização de feridas. Para essa determinação, alíquotas de padrão de hidroxiprolina e de amostras de tecido epitelial cicatricial (o mesmo tecido utilizado na determinação do peso do granuloma) foram misturados com hidróxido de sódio. As amostras foram hidrolisadas em solução básica (NaOH 2N) e submetidas à autoclavagem a 120 °C durante 20 minutos. Em seguida, o reagente cloramina T foi adicionado e a reação de oxidação deu-se por um período de 25 minutos a temperatura ambiente. Após a adição do reagente de Ehrlich, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65

°C por 20 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro em 550 nm. Para quantificação da hidroxiprolina foi construída uma curva padrão externa compreendendo concentrações entre 0,5 - 18,0 µg/mL. Foi utilizada como amostra padrão N-Acetil-L-hidroxiprolina > 99 %, Sigma 01192. Os resultados correspondem à média de amostras de tecido a partir de análises realizadas em triplicata (REDDY; ENWEMEKA, 1996).

4.2.2.3. Estudo histológico da lesão

A fim de elucidar as características predominantes do processo de cicatrização em camundongos isogênicos Balb/C foi realizado o estudo histológico das lesões. Para realização deste estudo, um grupo de camundongos isogênicos Balb/C (n=75) foi dividido entre os seguintes grupos experimentais: I) grupo controle negativo (CN: n=15) o qual recebeu apenas aplicação tópica diária de água destilada, o veículo utilizado na diluição dos extratos (n=3 por período de tratamento: 3, 6, 9, 12 e 15 dias); II) grupo controle positivo (CP: n=15) que recebeu aplicação tópica diária de alantoína (50mg/kg/dia) (n=3 por período de tratamento: 3, 6, 9, 12 e 15 dias); III) grupo teste I (EBAQ com lesão: n=15) que recebeu aplicação tópica diária de extrato bruto aquoso proveniente da casca de *Musa spp.* (n=3 por período de tratamento: 3, 6, 9, 12 e 15 dias); e IV) grupo teste II (EBAQ sem lesão: n=15) em que os animais não sofreram excisão do tecido epitelial dorsal, mas também receberam aplicação tópica diária de extrato bruto aquoso proveniente da casca de *Musa spp.* (n=3 por período de tratamento: 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

O tecido epitelial dos animais, após cada período de tratamento, foi retirado através de procedimento cirúrgico. Os tecidos assim obtidos apresentavam tamanho correspondente a área lesionada (1 cm²), além das bordas da lesão (0,5 cm de tecido adjacente à lesão). As amostras de tecido foram fixadas em solução de formalina a 10 %, mantidas posteriormente em álcool 70 % e encaminhadas para a realização do estudo histológico da lesão após coloração pelo método de Garvey et al. (1987). Nos cortes histológicos foram observados aspectos qualitativos e quantitativos da lesão.

Entre os aspectos qualitativos podemos citar proliferação de fibroblastos, maturação e organização das células escamosas epidermais, o grau de formação do tecido de granulação, reepitelização, formação de colágeno e formação de tecido cicatricial na derme. Em relação à análise quantitativa, foram consideradas as espessuras da camada de queratina,

da epiderme, da derme e da hipoderme, bem como o número de vasos e o de folículos pilosos.

Para a análise quantitativa, as espessuras das camadas do tecido epitelial foram mensuradas através de 10 (dez) réplicas para cada amostra (n=3, por período de tratamento). O número de vasos e o número de folículos pilosos foram mensurados através da contagem das estruturas em toda a extensão do corte histológico, o qual abrangeu a totalidade da área da lesão.

Em relação às mudanças nas camadas do tecido epitelial e nos demais parâmetros analisados, o tecido adjacente a lesão e que não recebeu tratamento foi utilizado como controle interno (CI) do grupo experimental. Portanto, denominamos CILEBAQ o controle interno dos animais que sofreram excisão tecidual e foram tratados com EBAQ e CIEBAQ o controle interno dos animais que não sofrerão excisão tecidual e receberam aplicação de EBAQ conforme os demais grupos de tratamento. Para diferenciar os grupos tratados com EBAQ, convencionou-se que EBAQL (animais submetidos à cirurgia para excisão tecidual e que receberam tratamento com o extrato) e EBAQSL (animais não submetidos à cirurgia e que receberam tratamento com extrato).

4.2.2.4. Marcadores de estresse oxidativo:

4.2.2.4.1. Nível de peroxidação lipídica (TBARS)

As amostras de tecido cicatricial foram precipitadas com ácido fosfórico 1,1%, homogeneizadas com cerca de 20 impactos. A lipoperoxidação foi determinada pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta baseia-se na reação de uma molécula de malonildialdeído (MDA) com 2 moléculas de TBA e a eliminação de 2 moléculas de água, formando um pigmento cor-de-rosa com absorção máxima a 532 – 535nm. As análises foram realizadas em triplicata e a leitura das amostras foi realizada em dois comprimentos de onda distintos, 532 e 600nm (HERMES-LIMA; WILLMORE; STOREY, 1995). A concentração final de TBARS foi calculada da seguinte maneira: $TBARS (nmol.mg \text{ de proteína}^{-1}) = \{[Absorbância \text{ da amostra } (A_{532} - A_{600}) \cdot 103 \cdot 340]/156\} / mg \text{ de proteína}$.

4.2.2.4.2. Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de pequenos tióis (SH) foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos, pois o SH pode oxidar-se. A glutathiona reage com o ácido ditionitrobenzótico (DTNB) e

forma o ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. A intensidade de coloração é proporcional à quantidade de GSH presente na amostra. Foi pesada uma massa de tecido cicatricial, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 20 %, homogeneizou-se o conteúdo e centrifugou-se a 5000 g, a uma temperatura de 4 °C por 10 minutos. Utilizou-se o sobrenadante límpido para a reação. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em $\mu\text{M}.\text{mg}$ de proteína⁻¹ (BEUTLER; DURAN; KELLY, 1963).

4.2.2.4.3. Dano oxidativo às proteínas (Carbonilação protéica)

O dano oxidativo as proteínas por carbonilação foi determinado a partir do homogenato ácido. Submete-se o precipitado à reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DTNB) e posterior dissolução em guanidina. As absorbâncias máximas no intervalo de 360 – 370 nm foram medidas e os valores finais das proteínas carboniladas determinados utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em nmol.mg de proteína⁻¹ (LEVINE et al., 1990).

4.2.2.4.4. Atividade da enzima catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima foi verificada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em um comprimento de onda de 240 nm. Uma solução de H₂O₂ (10 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM) pH 7,0 foi preparada e titulada. No dia da análise, foi utilizada como substrato da reação. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H₂O₂ e 20 μL de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os valores expressos em mmol de H₂O₂ consumido min⁻¹.mg de proteína⁻¹ (AEBI, 1984).

4.2.2.4.5. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A análise da enzima superóxido dismutase foi realizada por meio da oxidação da adrenalina com a formação do adenocromo. A formação desses compostos foi retardada pela enzima SOD presente na amostra. Em uma cubeta de plástico (3 mL) foram adicionados o tampão glicina (50mM) a temperatura ambiente e pH 10 e 50 μL da solução de adrenalina (60 mM) pH 2, mantida em gelo durante o ensaio. Em seguida, observa-se o gráfico com a oxidação da adrenalina expressa pela formação de uma curva ascendente. Agregou-se alíquota de

amostra antes que a reação de oxidação terminasse, ou seja, antes do início do decaimento da curva expressa no gráfico. Repetiu-se o ensaio com mais 2 ou 3 alíquotas distintas. A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte maneira: % inibição = $[(k_2/k_1) - 1] \cdot 100$, onde k_1 corresponde a porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina e k_2 corresponde a porção de inibição, expressa no gráfico, provocada pela SOD presente na amostra. Para o cálculo seguinte, graficou-se log da porcentagem de inibição (% , eixo y) X alíquota de amostra (μL , eixo x), e extrapolando 50% de inibição determinou-se o volume de alíquota correspondente. A curva teve no mínimo 3 pontos. Então, $1 \text{ U SOD.mg de proteína}^{-1} = [1/(x \mu\text{L} \cdot 1000 \cdot \text{diluição})] \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

4.2.2.4.6. Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação e produzindo glutathione oxidada (GSSG) (JONES et al., 1981; EPP; LANDENSTEIN; WENDEL, 1983). Para a determinação da atividade dessa enzima foi utilizado o método de Flohé e Gunzler (1984) usando 10 μL de amostra e 10 μL de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 mL de meio de reação, que continha 25 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR. Então, avalia-se a oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em um comprimento de onda de 340 nm, já que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela enzima glutathione redutase (GR). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os valores foram expressos em $\mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

4.2.2.4.7. Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida em um comprimento de onda de 340 nm, de acordo com Habig, Pabst e Jacoby (1976). A amostra era adicionada a um meio contendo 10 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μL de GSH 0,1 M e 970 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Essa técnica tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato para que a enzima GST, presente na amostra, conjugue a GSH ao CDNB e forme a substância detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 s. As

análises foram feitas em triplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

4.3. Atividade antitumoral

4.3.1. Ensaio de citotoxicidade in vitro

Células de TAE foram retiradas da cavidade abdominal do camundongo, no décimo dia após inoculação no animal, e na concentração de 5×10^6 células/mL foram transferidas para placas de cultura de 96 poços, contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10 %), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/mL) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio contendo concentrações crescentes de extratos provenientes de casca de *Musa* spp.: extrato bruto aquoso (EBAQ), extrato bruto hidroetanólico (EBHE) e extrato derivado de extração supercrítica (ESC); e as placas foram incubadas à 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO_2 .

Após 24 horas, as placas foram centrifugadas e o meio de cultura contendo as concentrações dos diferentes extratos foi retirado.

Um novo meio de cultura foi adicionado, desta vez contendo MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil; 0,5 mg/mL) e incubado por 3 horas à 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO_2 . Decorrido este período, as placas foram centrifugadas e o meio foi novamente retirado, sendo adicionado 100 μL de DMSO, para dissolver os cristais de formazan produzidos durante a incubação com MTT. As placas foram então avaliadas por meio de um leitor de Elisa, a 540 nm, para estabelecer a relação linear do número médio de células por poço no ensaio do MTT (adaptado de MOSMAN, 1983).

Cabe ressaltar que cada concentração foi testada em oito replicatas, em três experimentos individuais e em três dias. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = $\frac{(\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}}$

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória 50 %) foram calculados por regressão linear e expressos em média \pm desvio padrão. Considerou-se os valores do CN como 100% de viabilidade celular sem a presença dos extratos testados.

4.3.2. Ensaios *in vivo*

4.3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C distribuídos em grupos experimentais (n=12 por grupo, pesando 20 ± 2 g). Os animais foram previamente anestesiados e em seguida, foi realizada a inoculação de 0,2 mL de uma suspensão salina contendo 5×10^6 células do TAE por via intraperitoneal, na cavidade abdominal do animal, em condições assépticas, uma única vez, previamente ao tratamento dos animais.

O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero. O tratamento dos animais, por via i.p., iniciou 24 horas após a inoculação das células tumorais e foi realizado durante 9 dias consecutivos. Os animais pertencentes aos grupos testes foram tratados com 50 microlitros de solução de extrato de casca de Musa spp.. O grupo testes I recebeu doses de uma solução de extrato bruto aquoso (EBAQ) de concentração correspondente a 150mg/kg. O grupo teste II recebeu doses de uma solução de extrato supercrítico (ESC) de concentração correspondente a 150mg/kg. O EBAQ foi selecionado para o tratamento *in vivo*, com base nos resultados obtidos *in vitro* para avaliação da citotoxicidade, através do ensaio do MTT.

Os animais referentes ao grupo controle positivo foram tratados com 50 μ L de uma solução de doxorrubicina de concentração igual a 1,5 mg/kg, enquanto que os animais pertencentes aos grupos controle negativo (com inoculação de tumor) e normal (no qual não foi inoculado o tumor) foram tratados com 50 μ L de água (veículo utilizado para diluição do extrato a ser testado).

Todos os animais receberam duas doses diárias de 110 mg/kg de analgésico paracetamol, via oral por gavagem, para minimizar a dor causada pelos procedimentos e pelo desenvolvimento do tumor.

No décimo dia, seis animais de cada grupo foram anestesiados para coleta de líquido ascítico, a fim de determinar os níveis/conteúdos de marcadores de estresse oxidativo. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi retirado o restante do líquido ascítico para as demais análises.

Os animais restantes em cada grupo (n=6) foram mantidos vivos para avaliação da sobrevida comparada ao grupo controle negativo.

4.3.2.2. Avaliação da viabilidade celular

Através do método de exclusão do corante azul de tripan: a viabilidade celular foi avaliada pela incorporação do azul de tripan, um

corante que só penetra nas células mortas. Essas membranas perdem a capacidade de excluir o corante devido à parada de síntese de ATP, o que inviabiliza o funcionamento de bombas dependentes de energia. Esse fenômeno permite estimar indiretamente o grau de integridade da membrana celular. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999).

Após a retirada do líquido ascítico dos animais, a viabilidade celular foi determinada em câmara de Neubauer, utilizando-se uma solução constituída por 10 µL desse líquido, 890 µL de solução salina e 100 µL do corante azul de trypan (0,4 %). Os resultados foram expressos na proporção de células inviáveis/células viáveis.

4.3.2.3. Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas

O volume de líquido ascítico total foi mensurado utilizando tubos falcon graduados e os volumes de células compactadas foram determinados após a centrifugação a 3000 g por 5 minutos (REBELLO, 2004).

4.3.2.4. Avaliação da média de sobrevida

Para a determinação da sobrevida (n=6 por grupo), os animais inoculados com o TAE e tratados com o extrato de *Musa spp.* ou doxorrubicina e os não tratados foram observados diariamente e durante todo o período de vida. A partir desse monitoramento, foi realizado o registro da mortalidade diária por 30 dias e, posteriormente, foram calculadas a taxa média de sobrevida ($TMS = [\text{Dia da 1}^{\text{a}} \text{ morte} + \text{Dia da última morte}] / 2$) e o percentual de aumento da longevidade ($PAL = [(TMS \text{ do grupo tratado} / TMS \text{ do grupo controle}) - 1] \times 100$) (QUERESHI et al., 2001).

4.3.2.5. Avaliação da variação de peso e da medida da circunferência abdominal

Para avaliar a variação de peso dos camundongos, foi calculada a diferença entre o peso final (após os nove dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (peso dos animais no dia zero). Os resultados obtidos foram expressos em gramas.

Para determinar a variação da circunferência abdominal dos camundongos, foi calculada a diferença entre a medida final (após os nove dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia zero). Os resultados obtidos foram expressos em centímetros (REBELLO, 2004).

4.4. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância ANOVA, complementada por Teste *t*, quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e em média \pm desvio padrão.

No intuito de correlacionar as variáveis observadas no estudo histológico da lesão e o conteúdo de hidroxiprolina, aplicou-se o teste de correlação não-paramétrica de Spearman, considerando o valor de *p* bicaudal, assumindo um intervalo de confiança de 95 %.

5. Resultados

5.1. Determinação de galocatequina em extratos de casca de banana *Musa spp* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para determinação do teor de galocatequina nos extratos em estudo, primeiramente, foi obtida uma curva padrão externa de galocatequina (200 $\mu\text{g/mL}$ – 2,5 $\mu\text{g/mL}$), conforme a Figura 11.

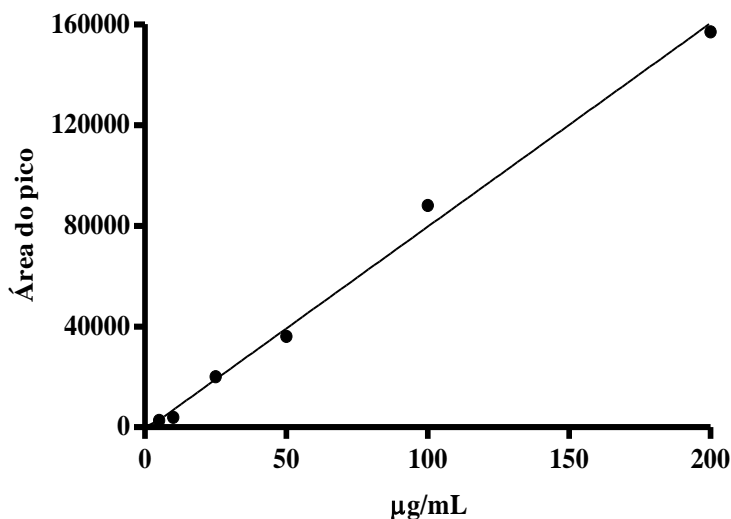


Figura 11. Curva padrão de galocatequina, cuja equação corresponde a $y=b.x$, onde $b=795,09$ e $r^2=0,997$.

Da análise de galocatequina nos produtos derivados de extrações convencionais e supercrítica foram obtidos os resultados apresentados na Figura 12 e na Tabela 2.

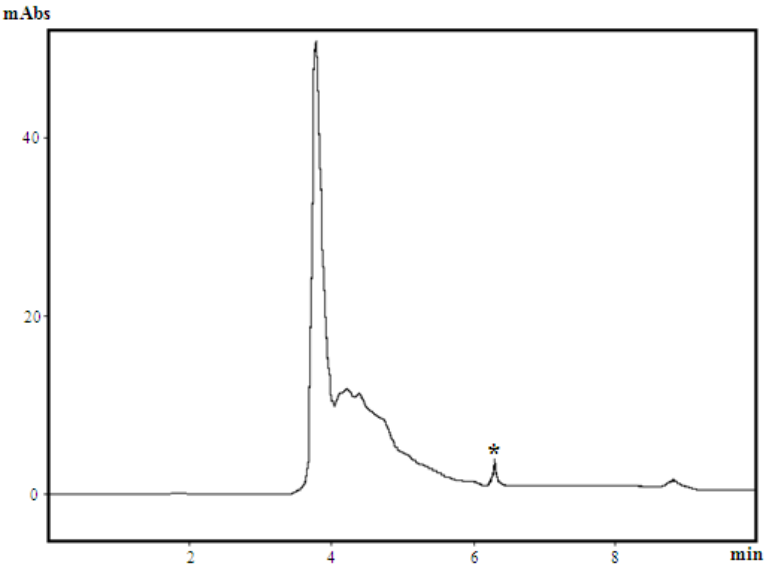


Figura 12. Perfil cromatográfico (280 nm) dos extratos (EBAQ, EBHE e extrato derivado de ESC) de casca de Musa spp. O pico da galocatequina está indicado com um asterisco (*), com tempo de retenção correspondente a 6,5 minutos. As análises foram realizadas em triplicata (para detalhes, veja 4. Metodologia: 4.2. Determinação de galocatequina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)).

Tabela 2. Resultados referentes à determinação de galocatequina em amostras de extratos de casca de banana Musa spp. (EBAQ: extrato bruto aquoso, EBHE: extrato bruto hidroetanólico e ESC: extrato derivado de extração supercrítica) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

| Amostra | Área média do pico | µg/mL galocatequina | mg galocatequina/100 g matéria seca |
|---------|--------------------------|------------------------|--|
| EBHE | 135,576 | 170,52 | 141,09 |
| EBAQ | 84,755 | 106,60 | 88,32 |
| ESC | 35,942 | 45,20 | 3,17 |

Observando o perfil cromatográfico, nota-se que o pico da galocatequina está indicado com um asterisco (*), muito embora este não seja o constituinte majoritário do extrato. O EBHE apresentou maior concentração de galocatequina na sua composição, seguido do EBAQ e do ESC, este último apresentou o menor conteúdo do flavonóide em questão. Provavelmente, o constituinte majoritário correspondente ao pico com tempo de retenção próximo a 4,0 minutos, pode estar relacionado ao conteúdo de epigallocatequina presente nas amostras de extratos de casca de *Musa spp.*.

5.2. Atividade cicatrizante

5.2.1. Parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato

5.2.1.1. Morfometria da lesão

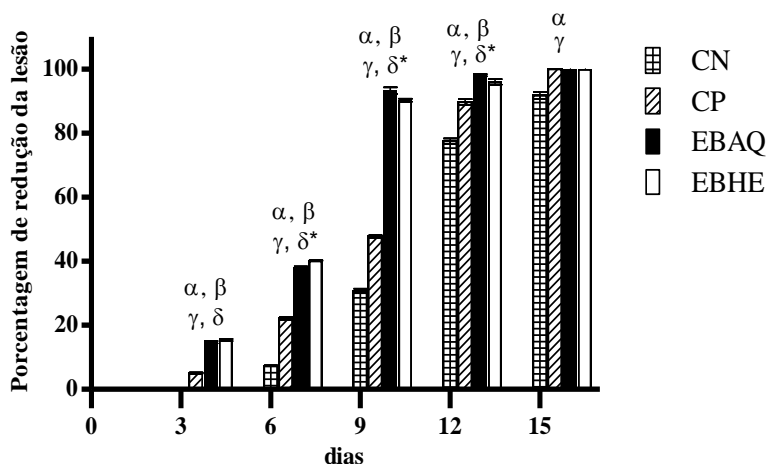


Figura 13. Porcentagem de redução da lesão observada a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada barra representa média \pm erro padrão da média ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

A porcentagem de redução da lesão ou contração da lesão foi determinada a partir das fotografias obtidas em intervalos de tempo de 3 dias até total cicatrização da lesão inicial. O tempo de cicatrização dos animais do controle negativo estendeu-se por um período de 15 dias. Portanto, esse foi o período de tempo máximo padronizado para determinar os parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato (Figura 13).

A contração da lesão nos diferentes intervalos de tempo mostrou-se estatisticamente significativa quando comparados os animais tratados, tanto EBAQ ($p<0,0001$) quanto EBHE ($p<0,0001$), com os controles positivo (CP) e negativo (CN). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos EBAQ e EBHE quando comparados ao grupo controle positivo após 15 dias de tratamento, ou seja, ao final do período experimental.

Os animais do grupo EBAQ apresentaram maior porcentagem de redução da lesão estatisticamente significativa nos períodos de tratamento correspondentes a 9 e 12 dias ($p<0,05$), quando comparados ao grupo tratado com EBHE.

O tratamento das lesões com EBHE, durante 6 dias, proporcionou maior porcentagem de redução da lesão, quando comparado ao tratamento com EBAQ ($p<0,05$).

Não houve diferença estatística entre os grupos EBAQ e EBHE nos tratamentos de 3 e 15 dias.

O período de epitelização foi determinado a partir da observação diária dos animais. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Período de epitelização para conclusão do processo cicatricial observado através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) ($n=6$, por grupo de tratamento). Grupos de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico. A diferença estatística foi simbolizada por α, β $p<0,0001$, onde α : CN e β : CP.

| Grupo de tratamento | Tempo de epitalização (dias) |
|---------------------|---|
| CN | 14 ^{β} |
| CP | 11 ^{α} |
| EBAQ | 9 ^{α, β} |
| EBHE | 9 ^{α, β} |

Observou-se uma diferença significativa entre os dois grupos de tratamento EBAQ ($p<0,0001$) e EBHE ($p<0,0001$) tanto em relação ao grupo CP quanto ao grupo CN. Não foi observada diferença estatística entre os grupos EBAQ e EBHE.

5.2.1.2. Conteúdo de hidroxiprolina

Como pode ser observado na Figura 14, o tratamento das lesões com EBAQ promoveu um aumento progressivo do conteúdo de hidroxiprolina estatisticamente significativo ao longo de todo o período experimental ($p<0,01$), em relação ao grupo CN. O mesmo ocorreu quando o grupo tratado com EBAQ foi comparado com o grupo CP ($p<0,001$).

Nos animais tratados com EBHE também foi quantificado um aumento significativo no conteúdo de hidroxiprolina ao longo dos 15 dias do período experimental, em comparação ao grupo CN ($p<0,01$).

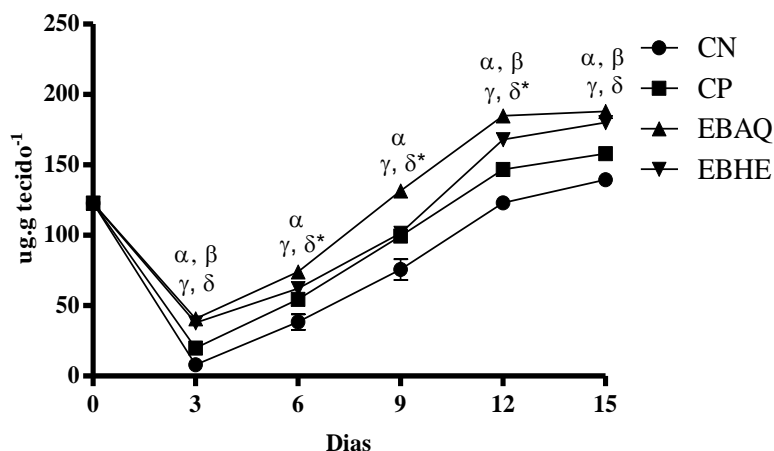


Figura 14. Conteúdo de hidroxiprolina determinado a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por nível basal/dia zero EBAQ e EBHE $p<0,0001$, β, δ $p<0,001$, * e α, γ $p<0,01$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

Em relação ao CP, o tratamento com EBHE proporcionou aumento significativo no conteúdo de hidroxiprolina nos períodos de tratamento correspondente a 3, 12 e 15 dias ($p < 0,001$, respectivamente). Enquanto, durante os períodos de 6 dias e 9 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com EBHE e o grupo CP.

Comparando os tratamentos com EBAQ e EBHE, foi observado um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de hidroxiprolina no tecido dos animais que receberam aplicação de EBAQ nos períodos de experimento de 6, 9 e 12 dias ($p < 0,01$, respectivamente).

Não foi observada diferença estatística entre os grupos EBAQ e EBHE aos 3 dias e aos 15 dias de tratamento.

Ao término do período de tratamento e conclusão da cicatrização, observou-se que o conteúdo de hidroxiprolina aumentou significativamente no tecido cicatricial dos animais tratados com os extratos de casca de banana, em relação aos controles positivo ($p < 0,001$) e negativo ($p < 0,01$), assim como ao nível basal (EBAQ 15 dias e EBHE 15 dias: $p < 0,0001$). Diante disso, acredita-se que os tratamentos com os extratos de casca de Musa spp. podem ser capazes de induzir proliferação celular culminando, portanto, numa maior produção de colágeno nos tecidos cicatriciais.

5.2.2. Marcadores de estresse oxidativo

5.2.2.1. Nível de peroxidação lipídica (TBARS)

Foi detectada diferença estatística significativa nas concentrações de lipoperóxidos, quando comparados os grupos EBAQ e EBHE ao grupo CN. Os animais tratados com EBAQ exibiram uma considerável diminuição da lipoperoxidação no tecido epitelial durante todo o período cicatricial ($p < 0,001$), quando comparados aos do grupo CN, mantendo o nível de dano tecidual abaixo do que foi observado em tecido cutâneo normal, conforme indicado pelo dia 0 (zero) na Figura 15. O grupo EBHE diminuiu o nível de peroxidação lipídica nos períodos de tratamento de 3, 6, 12 e 15 dias ($p < 0,001$, respectivamente), em relação ao grupo CN.

Em relação ao grupo CP, os animais tratados com EBAQ apresentaram nível de lipoperoxidação menor e estatisticamente significativo, com $p < 0,01$ para todos os intervalos de tempo do período experimental. Já o tratamento com EBHE mostrou-se estatisticamente significativo ao diminuir a concentração de lipoperóxidos apenas ao

final do experimento, isto é, aos 15 dias de tratamento ($p<0,01$), enquanto que esta diminuição não foi significativa nos períodos de tratamento correspondentes a 3 e 12 dias. No período de 6 dias de tratamento com EBHE não houve diferença estatística quanto ao aumento no nível de peroxidação lipídica. Porém, este aumento foi significativo no período de 9 dias de tratamento com EBHE ($p<0,01$), em comparação ao CP.

Entre os grupos tratados com EBAQ e EBHE, observou-se diferença estatística significativa quanto ao dano tecidual ao longo de todo o período experimental. Da mesma forma, foi observado um dano tecidual menor que o normal, principalmente, nas amostras de tecido cicatricial dos animais do grupo EBAQ ($p<0,01$).

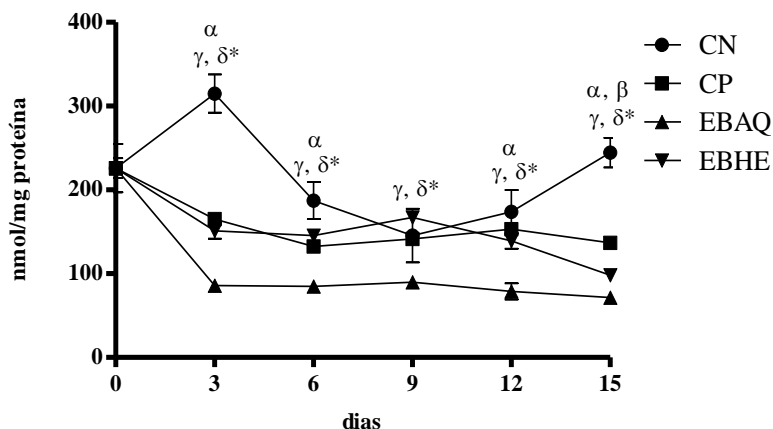


Figura 15. Nível de peroxidação lipídica a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por α, γ $p<0,001$, nível basal/dia zero EBAQ e EBHE, β, δ e $*$ $p<0,01$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e $*$: EBAQ em relação ao EBHE.

Ao final de 15 dias de tratamento e conclusão do processo de cicatrização, observou-se que o nível de peroxidação lipídica diminuiu significativamente em relação aos controles positivo ($p<0,01$) e negativo

($p<0,001$), assim como ao nível basal (EBAQ 15 dias e EBHE 15 dias: $p<0,01$).

5.2.2.2. Dano oxidativo às proteínas (Carbonilação protéica)

A exemplo dos níveis de lipoperoxidação foi observada diferença significativa na concentração da proteína carbonilada ao longo de todo o tratamento e processo cicatricial (Figura 16) entre os grupos EBAQ ($p<0,05$) e CN, bem como entre os grupos EBHE ($p<0,05$) e CN.

Seguindo a resposta constatada nos níveis de lipoperoxidação, ocorreu uma forte diminuição no nível de carbonilação protéica, principalmente, nas amostras de tecido cicatricial dos grupos EBAQ e EBHE até total conclusão do processo de cicatrização ao final de 15 dias de tratamento dos animais.

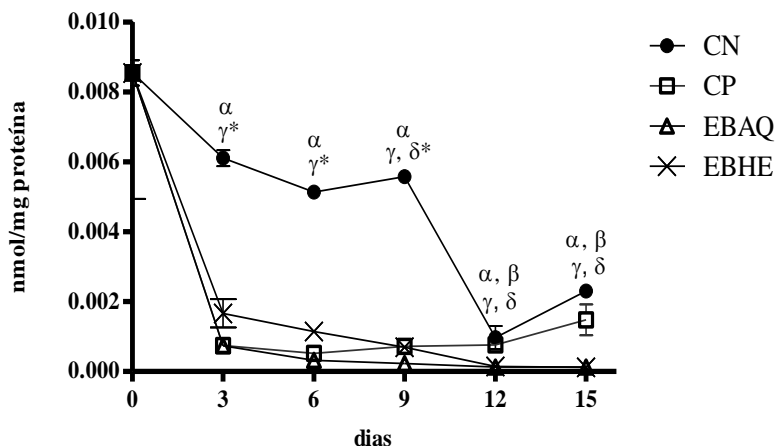


Figura 16. Nível de carbonilação protéica a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por nível basal/dia zero EBAQ e EBHE $p<0,0001$, β, δ $p<0,01$, * e α, γ $p<0,05$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

Comparado ao grupo CP, o tratamento com EBAQ foi capaz de diminuir significativamente o dano em proteínas a partir do período

experimental equivalente a 9 dias de tratamento até o final deste aos 15 dias ($p<0,01$, respectivamente). Nos períodos de 3 e 6 dias de tratamento com EBAQ não houve diferença estatística em relação ao grupo CP. O grupo EBHE apresentou um nível de carbonilação protéica significativamente diminuído, em relação ao grupo CP, nos períodos de 12 e 15 dias ($p<0,01$, respectivamente). Aos 6 dias de tratamento, o tecido cicatricial dos animais tratados com EBHE apresentou maior dano às proteínas quando comparado com o tecido de animais do grupo CP ($p<0,01$). Nos demais períodos de tratamento com EBHE (3 dias e 9 dias) não foi observada diferença estatística significativa em relação ao controle positivo.

Comparando os grupos EBAQ e EBHE, observou-se que o nível de carbonilação protéica diminuiu significativamente nos períodos de tratamento correspondentes a 3, 6 e 9 dias ($p<0,05$, respectivamente). Aos 12 dias de tratamento, o dano às proteínas foi menor no grupo tratado com EBAQ e aos 15 dias no grupo tratado com EBHE. Todavia, não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos nestes períodos.

Ao final de 15 dias de tratamento e conclusão do processo de cicatrização, observou-se que o nível de carbonilação protéica diminuiu significativamente em relação aos controles positivo ($p<0,01$) e negativo ($p<0,05$), assim como ao nível basal (EBAQ 15 dias e EBHE 15 dias: $p<0,0001$).

5.2.2.3. *Conteúdo de glutathione reduzida (GSH)*

Analisando o período de cicatrização como um todo, foi observada uma tendência de normalização nos níveis de GSH, em relação ao nível basal determinado no dia 0 (zero) (Figura 17), tanto no grupo de animais tratados com EBHE ($p=0,1670$) quanto no grupo EBAQ ($p=0,0602$). A partir dos valores de p obtidos, pode-se inferir que não houve diferença estatística significativa entre os valores basais de GSH e os níveis alcançados ao final da cicatrização. Portanto, os tratamentos com os extratos de casca de banana foram capazes de restabelecer os níveis dessa defesa antioxidante no tecido cicatricial dos animais.

Conforme a Figura 16, o conteúdo de GSH nas amostras de tecido cicatricial provenientes dos animais tratados com EBAQ apresentou-se mais elevado e estatisticamente significativo durante todo o período experimental ($p<0,0001$), quando comparado aos grupos CP e CN ($p<0,0001$).

Houve também um aumento significativo no conteúdo de GSH ao longo de todo o processo cicatricial nos tecidos cutâneos dos animais tratados com EBHE, em relação aos grupos CP ($p<0,0001$) e CN ($p<0,0001$).

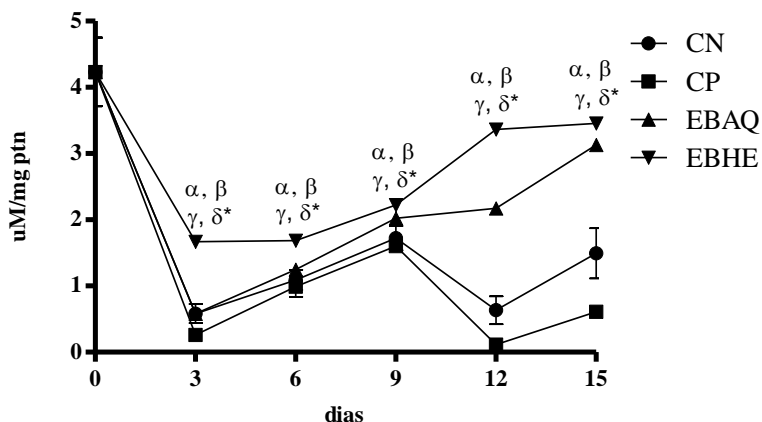


Figura 17. Conteúdo de GSH a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ $p<0,0001$, * $p<0,05$ e nível basal/dia zero EBHE $p=0,1670$ e EBAQ $p=0,0602$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

5.2.2.4. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT esteve aumentada no tecido cicatricial dos animais pertencentes aos grupos controles positivo e negativo, bem como no grupo tratado com EBHE, principalmente, nos primeiros dias do processo de cicatrização da lesão, conforme a Figura 18. E, além disso, o aumento na atividade enzimática da CAT permaneceu aumentado no grupo CN até o final dos 15 dias do período experimental.

É observado ainda que, no início da cicatrização, o tecido cicatricial dos animais provenientes do grupo tratado com EBAQ apresentou uma diminuição estatisticamente significativa da atividade enzimática da CAT, quando comparada as atividades dos grupos CP (3 e

6 dias: $p<0,01$, respectivamente) e CN (3 e 6 dias: $p<0,05$), bem como em relação ao grupo EBHE e o CP (3 e 6 dias: $p<0,01$, respectivamente) e EBHE e CN (3 e 6 dias: $p<0,05$).

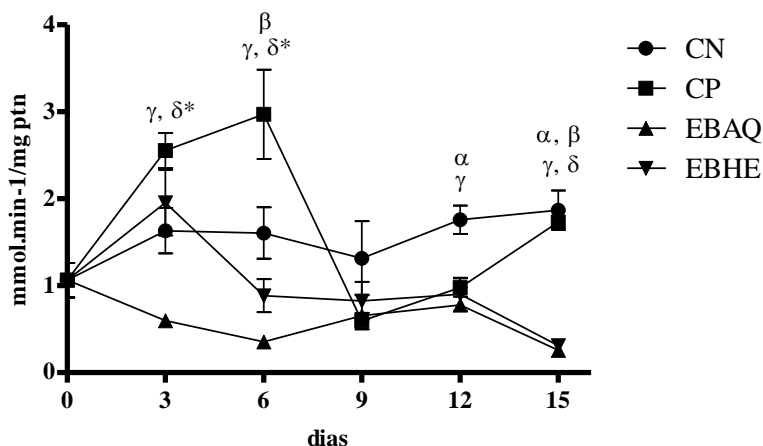


Figura 18. Atividade da CAT a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por nível basal/dia zero EBAQ e EBHE, β, δ e * $p<0,01$, α, γ $p<0,05$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

Dando continuidade ao processo cicatricial, observou-se que houve diferença estatística significativa aos 12 e aos 15 dias ($p<0,001$, respectivamente) de tratamento com EBAQ, em relação ao CN. E quando comparado com o grupo CP, o tratamento com EBAQ mostrou-se significativo somente ao final dos 15 dias do processo cicatricial ($p<0,05$). Sendo assim, não foi observada diferença estatística significativa nos demais períodos que correspondem aos 9 dias de tratamento com EBAQ, em relação aos controles positivo e negativo; e aos 12 dias de tratamento com EBAQ, em relação ao CP.

O tratamento com EBHE não foi capaz de diminuir a atividade da CAT, nos primeiros dias do processo de cicatrização, de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo CN. Entretanto, quando comparado ao CP, o tratamento com EBHE promoveu a

diminuição da atividade da CAT nos primeiros dias do processo cicatricial, porém houve diferença estatística significativa apenas aos 6 dias deste tratamento, com $p < 0,01$. E, também, aos 12 e aos 15 dias ($p < 0,05$) de tratamento com EBHE houve diferença significativa em relação ao CN.

Quando comparados os tratamentos com EBAQ e EBHE, foi observada diferença estatística significativa apenas aos 3 e 6 dias do período cicatricial ($p < 0,01$).

Ao término do período de tratamento e conclusão da cicatrização, observou-se que a atividade da CAT diminuiu significativamente em relação aos controles positivo (EBAQ 15 dias e EBHE 15 dias: $p < 0,01$) e negativo (EBAQ 15 dias e EBHE 15 dias: $p < 0,05$), assim como ao nível basal (EBAQ 15 dias e EBHE 15 dias: $p < 0,01$). Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com EBAQ e EBHE aos 9, 12 e 15 dias do período experimental.

5.2.2.5. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

De acordo com a Figura 19, a enzima SOD apresentou atividade elevada nos estágios iniciais da cicatrização, porém de maneira geral mostrou tendência de normalização ao nível basal em todos os grupos experimentais. Assim, o tratamento com EBAQ não apresentou diferença estatística significativa em relação ao nível basal ($p = 0,9323$) e, por isso, pode-se inferir que este tratamento conseguiu restabelecer a atividade enzimática da SOD.

Em contrapartida, o tratamento com EBHE não conseguiu fazer com que a atividade da enzima no tecido cicatricial diminuísse após os 15 dias de tratamento até atingir o seu nível basal, apresentando diferença estatística, com $p = 0,0226$.

Nos tecidos cicatriciais dos animais tratados com EBHE e, principalmente, com EBAQ houve diferença significativa na atividade enzimática da SOD, que esteve diminuída durante todo o período cicatricial em relação aos grupos CP ($p < 0,05$) e CN ($p < 0,01$).

Também foi observada diferença significativa entre os grupos EBAQ e EBHE. A atividade enzimática esteve diminuída e estatisticamente diferente no grupo EBAQ nos períodos de tratamento correspondente a 3, 9, 12 e 15 dias ($p < 0,05$) do processo de cicatrização. Somente aos 6 dias de tratamento essa diminuição da atividade da SOD não foi significativa, quando comparados os grupos EBAQ e EBHE.

O fato da atividade enzimática da catalase estar diminuída, provavelmente, está relacionado ao conteúdo de galocatequina presente nos extratos de casca de banana. A galocatequina é uma substância com

atividade antioxidante e, possivelmente, está interferindo na neutralização de espécies reativas, como o ânion superóxido. Assim, ao mesmo tempo em que a atividade da enzima superóxido dismutase é gradualmente diminuída ao longo do tratamento com os extratos de casca de Musa spp., não há produção de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, a galocatequina presente nos extratos utilizados nos tratamentos dos animais interfere na atividade da enzima catalase diminuindo sua atividade, uma vez que no meio está diminuída a geração de peróxido de hidrogênio. Consequentemente, é menor a necessidade de transformá-lo em água e oxigênio e impedir a formação de radical hidroxil, o qual é potencialmente danoso para o organismo.

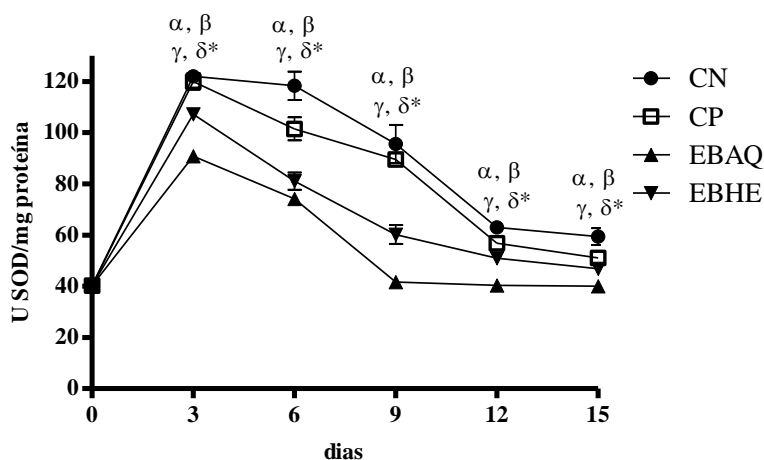


Figura 19. Atividade da SOD a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana Musa spp (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por α, γ $p<0,01$, * e β, δ $p<0,05$ e nível basal/dia zero EBHE $p=0,0226$ e EBAQ $p=0,9323$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

5.2.2.6. Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

Durante todo o período de tratamento, o tecido cicatricial do grupo controle negativo apresentou atividade elevada da GPx (Figura 20). Quando comparados os grupos EBAQ e EBHE ao CN, pode-se

observar diferença significativa quanto à diminuição da atividade enzimática no tecido cicatricial dos animais tratados com os respectivos extratos durante todo o período cicatricial (EBAQ e EBHE, $p < 0,0001$). Enquanto isso, o tecido cicatricial dos animais tratados tanto com EBAQ quanto com EBHE apresentou atividade enzimática semelhante entre si, pois não houve diferença estatística.

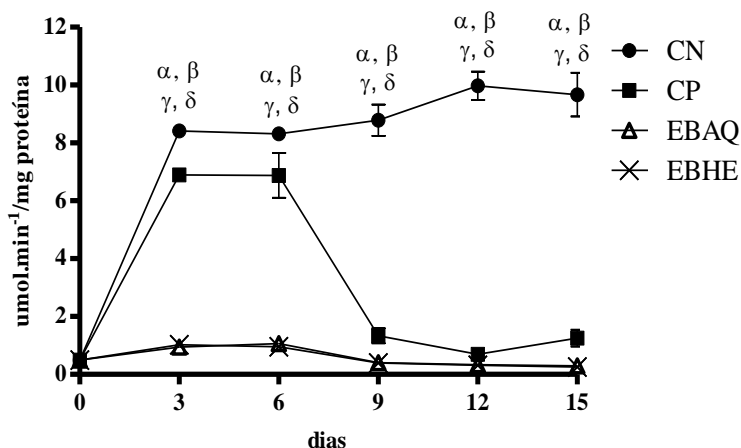


Figura 20. Atividade da GPx a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por α, γ $p < 0,0001$, β, δ $p < 0,01$ e nível basal/dia zero EBHE $p < 0,05$ e EBAQ $p < 0,01$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN e δ : EBAQ em relação ao CP.

Quanto a relação entre o grupo CP e os grupos EBAQ e EBHE, observou-se que o tratamento com os dois extratos foi capaz de manter a atividade da GPx próximo aos valores basais dessa, ao longo de todo o período experimental, com diferença estatística significativa ($p < 0,01$).

Em relação à atividade enzimática basal da GPx determinado no dia 0 (zero), o tratamento com EBAQ fez com que essa enzima mantivesse sua atividade aqui considerada normal a partir dos 9 dias até o final do período cicatricial, pois não foi observada diferença estatística significativa. Entretanto, aos 3 e 6 dias ($p < 0,01$) do tratamento com EBAQ foi observado aumento significativo em relação a atividade

enzimática basal. Já o tratamento com EBHE foi capaz de manter os níveis enzimáticos basais durante boa parte do processo cicatricial, exceto aos 6 dias ($p<0,05$) deste em que foi observado um aumento significativo na atividade da GPx. Cabe ressaltar que o tratamento com EBHE foi capaz de diminuir de maneira significativa a atividade dessa enzima ao final dos 15 dias do período experimental, com $p<0,05$.

5.2.2.7. Atividade da enzima glutationa S-transferase (GST)

Conforme a Figura 21, a atividade da GST no tecido cicatricial dos animais do grupo CN mostrou-se alterada e estatisticamente diferente em relação ao grupo tratado com EBAQ durante quase todo o processo cicatricial ($p<0,05$), exceto aos 12 dias de tratamento em que não houve diferença estatística. Enquanto isso, o tratamento com EBHE foi eficaz e significativo, em relação ao grupo CN, aos 3, 6 e 15 dias ($p<0,05$) do processo cicatricial. Nos demais períodos observados não houve diferença significativa.

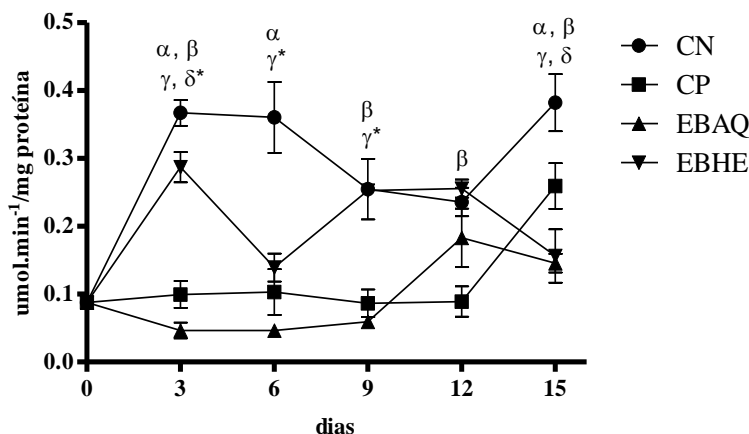


Figura 21. Atividade da GST a cada 3 dias durante 15 dias de tratamento com extratos de casca de banana *Musa spp* (EBAQ e EBHE) em relação aos grupos controles. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; EBAQ = extrato bruto aquoso e EBHE = extrato bruto hidroetanólico). A diferença estatística foi simbolizada por * e nível basal/dia zero EBHE e EBAQ $p<0,01$ e $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ $p<0,05$, onde α : EBHE em relação ao CN, β : EBHE em relação ao CP, γ : EBAQ em relação ao CN, δ : EBAQ em relação ao CP e *: EBAQ em relação ao EBHE.

Em relação ao CP, não foi observada diferença significativa no comportamento dessa enzima nos períodos de tratamento com EBAQ correspondentes a 6, 9 e 12 dias. Porém, foi observada uma diminuição significativa da atividade enzimática no início e ao fim do processo cicatricial (3 e 15 dias: $p<0,05$).

Ao longo do processo de cicatrização da lesão, observou-se que no grupo tratado com EBAQ a atividade enzimática da GST foi mantida próximo aos níveis basais e apresentou uma alteração significativa ao final do processo (EBAQ 15 dias: $p<0,01$). Todavia, somente até os 9 dias de tratamento o grupo tratado com EBAQ (3, 6 e 9 dias: $p<0,01$) mostrou menor atividade da enzima com diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com EBHE. E ao final do período de tratamento, os níveis enzimáticos basais do tecido cicatricial dos animais provenientes do grupo EBHE foram atingidos, conforme observado no tratamento com EBAQ ($p<0,01$).

Além disso, o grupo tratado com EBHE mostrou diferença significativa na atividade enzimática, que esteve diminuída quando comparada aos grupos CN (aos 3, 6 e 15 dias: $p<0,05$). Aos 9 dias e aos 12 dias não foi observada diferença significativa em relação ao aumento da atividade enzimática nos tecidos cicatriciais tratados com EBHE quando comparado ao CN. Outra diferença estatística significativa importante ocorreu quando estabelecida uma relação entre o CP e o tratamento com EBHE. Neste último, a atividade da GST esteve significativamente aumentada, em relação ao CP, até os 12 dias do processo de cicatrização ($p<0,05$), exceto aos 6 dias em que não foi observada diferença estatística. Ao final do processo cicatricial, ocorreu uma diminuição da atividade enzimática, em relação ao CP, porém essa não foi significativa.

5.2.3. Estudo histológico da lesão

Além de investigar macroscopicamente e bioquimicamente o processo de cicatrização promovido pelos extratos de casca de *Musa spp*, foi realizado o estudo histológico das lesões em camundongos tratados com EBAQ. O objetivo do estudo histológico foi corroborar, a nível tecidual, o potencial cicatrizante do EBAQ, o qual mostrou-se mais efetivo com respeito aos parâmetros bioquímicos e morfométricos da lesão quando comparado ao tratamento com EBHE. Da mesma forma, o potencial cicatrizante do EBAQ apresentou-se mais promissor em relação ao tratamento com alantoína nos animais pertencentes ao grupo controle positivo.

Em uma primeira análise das preparações histológicas, observou-se, após 3 dias do período cicatricial, a presença de uma crosta fibrino-leucocitária localizada na superfície da área lesada nas amostras de tecido dos grupos CN, CP e EBAQL (Figura 22).

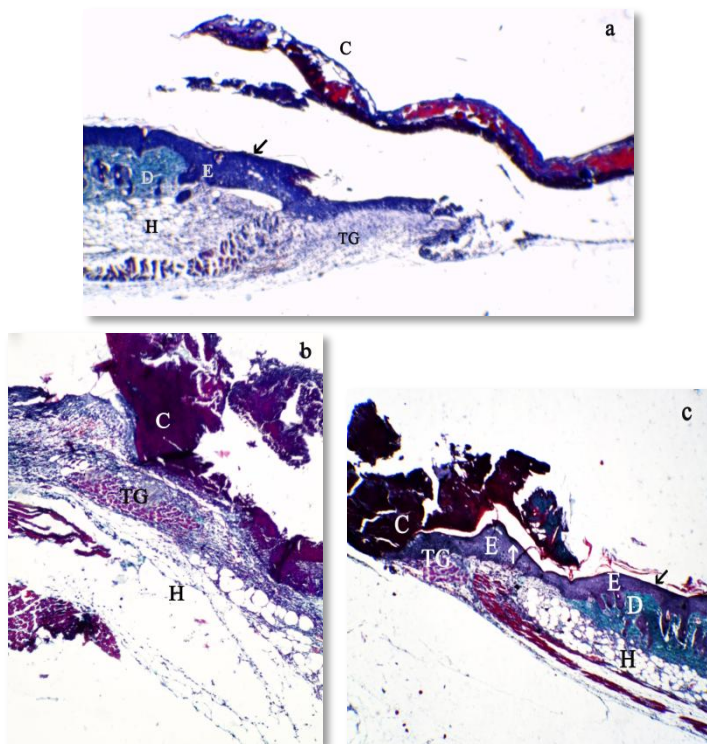


Figura 22. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 3 dias de tratamento. Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento), onde a = CN: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita; b = CP; c = EBAQL: tecido normal adjacente a lesão à direita (CILEBAQ) e epitélio granular à esquerda. Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x. C: crosta fibrino-leucocitária; E: epiderme; TG: tecido de granulação; D: derme; H: hipoderme; →: camada de queratina.

Em seguida, observou-se o espessamento da camada de queratina (Figuras 22, 23, 24, 25 e 26), principalmente no grupo EBAQL, que variou entre 4,12 e 11,69 μm ; tendo uma espessura média \pm erro padrão

da média de $6,76 \pm 1,65 \mu\text{m}$ (Tabela 8). No grupo CILEBAQ (Tabela 7), a espessura média \pm erro padrão da média foi $4,40 \pm 1,56 \mu\text{m}$, com variação entre 3,17 e $5,40 \mu\text{m}$. A espessura média \pm erro padrão da média da camada de queratina do grupo CN (Tabela 4) foi de $6,04 \pm 1,78 \mu\text{m}$ e variou entre 4,50 e $7,52 \mu\text{m}$.

No grupo CP (Tabela 5), observou-se uma variação da espessura de queratina entre 1,17 e $10,22 \mu\text{m}$, e uma espessura média \pm erro padrão da média de $5,11 \pm 0,87 \mu\text{m}$. No grupo EBAQSL (Tabela 9), a espessura média \pm erro padrão da média da camada de queratina correspondeu a $3,72 \pm 0,36 \mu\text{m}$, com variação entre 3,45 e $4,60 \mu\text{m}$, enquanto que seu CIEBAQ (Tabela 6) apresentou espessura média \pm erro padrão da média igual a $3,46 \pm 0,50 \mu\text{m}$ e variação entre 3,03 e $3,78 \mu\text{m}$.

Este espessamento da camada de queratina aumentou significativamente, no tecido dos animais EBAQL (Tabela 8): aos 3 dias de tratamento, aos 6 dias e aos 9 dias ($p < 0,001$) em relação ao tecido dos animais pertencentes ao grupo CN; aos 3 dias, aos 6 dias e aos 15 dias de tratamento ($p < 0,01$) em relação ao grupo CP; durante todo o período experimental quando estabelecida a relação com o tecido dos animais do grupo EBAQSL ($p < 0,05$) (Tabela 9); quando comparada ao grupo CILEBAQ aos 3 dias e aos 6 dias do período cicatricial ($p < 0,01$) (Tabela 7). Foi observado que a camada de queratina sofreu uma diminuição significativa aos 12 dias de tratamento no grupo EBAQL em relação ao CN ($p < 0,001$), aos 9 dias e aos 12 dias em relação ao CP ($p < 0,01$). Ocorreu o espessamento da camada de queratina aos 12 dias e aos 15 dias de tratamento no grupo EBAQL em relação ao CILEBAQ, porém não foi observada diferença estatística significativa. Da mesma forma, não foi observada diferença significativa quanto a diminuição dessa camada aos 15 dias de tratamento no grupo EBAQL em relação ao controle negativo, bem como aos 9 dias de tratamento em relação ao grupo CILEBAQ.

E ao estabelecer uma relação entre o grupo EBAQSL e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), notou-se que aconteceu um espessamento significativo da camada de queratina na área de epitélio que recebeu aplicação do extrato (EBAQSL) aos 3, 6, 9 e 12 dias ($p < 0,05$). Entretanto, aos 15 dias, quando finalizado o período de tratamento, ocorreu uma diminuição significativa dessa camada na porção do tecido EBAQSL ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 8, a epiderme do tecido epitelial dos animais do grupo EBAQL apresentou espessura média \pm erro padrão da média de $46,55 \pm 4,86 \mu\text{m}$, variando entre 28,95 e $71,69 \mu\text{m}$. No grupo

CILEBAQ a espessura média \pm erro padrão da média foi $17,13 \pm 1,47$ μm , com variação entre 12,41 e 21,21 μm .

A espessura média \pm erro padrão da média da epiderme do grupo CN correspondeu a $36,59 \pm 2,65$ μm e variou entre 23,31 e 51,14 μm (Tabela 4). No grupo CP (Tabela 5), observou-se uma variação da espessura entre 32,04 e 77,15 μm e uma espessura média \pm erro padrão da média de $57,28 \pm 2,78$ μm . No grupo EBAQSL (Tabela 9) a espessura média \pm erro padrão da média correspondeu a $9,95 \pm 0,30$ μm , com variação entre 7,71 e 13,62 μm , enquanto que seu respectivo CIEBAQ (Tabela 6) apresentou espessura média \pm erro padrão da média igual a $15,59 \pm 0,44$ μm e variação entre 14,75 e 16,37 μm .

Observando os resultados expressos nas Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9, assim como nas Figuras 25, 26, 27, 28 e 29, nota-se que a epiderme sofreu um espessamento significativo no tecido dos animais do grupo EBAQL: aos 3 dias de tratamento, aos 6 dias e aos 9 dias em relação ao tecido dos animais do grupo CN ($p < 0,001$); durante todo o período experimental quando estabelecida a relação com o tecido dos animais do grupo EBAQSL ($p < 0,05$); quando comparada ao grupo CILEBAQ também durante todo o período cicatricial ($p < 0,01$).

Observou-se que a camada epidérmica diminui sua espessura de maneira significativa aos 12 dias de tratamento no grupo EBAQL em relação ao CN, bem como aos 15 dias ($p < 0,001$). Desde os 3 dias até os 12 dias de tratamento do grupo EBAQL (Tabela 8) ocorreu uma diminuição da espessura da epiderme em relação ao grupo CP (Tabela 5), porém essa diminuição foi estatisticamente significativa apenas aos 9 dias e aos 12 dias ($p < 0,01$). Aos 15 dias de tratamento, houve um espessamento da epiderme, o qual não apresentou diferença estatística significativa.

Comparando o grupo EBAQSL (Tabela 9) e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), notou-se que aconteceu uma diminuição significativa da espessura da epiderme do grupo EBAQSL ao longo de todo o período experimental ($p < 0,05$).

De maneira geral, o tecido de granulação apresentou-se claramente distribuído em duas regiões distintas, uma mais superficial (derme) e outra mais profunda (hipoderme) em todos os grupos experimentais (Figuras 25, 26, 27, 28 e 29). Na camada dérmica houve uma maior diferenciação, com maior número de fibras colágenas e fibroblastos, sendo que ambos tenderam a uma disposição paralela à superfície da ferida; na região hipodérmica, mais hialina, foi observada uma menor quantidade de fibras e fibroblastos.

Tabela 4. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CN observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com água (veículo). Cada lacuna representa média \pm erro padrão da média (n=3, por dia, por grupo de tratamento).

| Dia | Espessura camada queratina (μm) | Espessura epiderme (μm) | Espessura derme (μm) | Espessura hipoderme (μm) | Número vasos | Número folículos pilosos |
|-----|--|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 3 | 7,52 \pm 0,89 | 51,14 \pm 3,65 | 246,70 \pm 28,94 | 217,25 \pm 42,95 | 6,00 \pm 0,42 | 0,00 \pm 0,00 |
| 6 | 7,18 \pm 0,92 | 31,73 \pm 1,40 | 263,46 \pm 8,35 | 269,24 \pm 6,01 | 4,67 \pm 0,15 | 4,33 \pm 0,39 |
| 9 | 4,50 \pm 0,35 | 23,31 \pm 1,79 | 322,46 \pm 1,94 | 189,84 \pm 20,80 | 7,33 \pm 0,17 | 8,33 \pm 1,00 |
| 12 | 4,90 \pm 0,55 | 37,68 \pm 4,42 | 342,59 \pm 25,89 | 231,29 \pm 8,87 | 5,33 \pm 0,47 | 11,00 \pm 1,05 |
| 15 | 6,08 \pm 1,19 | 39,12 \pm 2,00 | 319,39 \pm 39,11 | 213,36 \pm 9,68 | 4,67 \pm 0,29 | 12,33 \pm 1,03 |

Tabela 5. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CP observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com alantoína. Cada lacuna representa média \pm erro padrão da média (n=3, por dia, por grupo de tratamento).

| Dia | Espessura camada queratina (μm) | Espessura epiderme (μm) | Espessura derme (μm) | Espessura hipoderme (μm) | Número vasos | Número folículos pilosos |
|-----|--|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 3 | 1,17 \pm 0,27 | 77,15 \pm 1,42 | 242,55 \pm 8,91 | 311,13 \pm 41,54 | 2,00 \pm 0,35 | 0,00 \pm 0,00 |
| 6 | 5,11 \pm 0,06 | 71,34 \pm 2,69 | 310,27 \pm 30,12 | 351,64 \pm 9,78 | 3,50 \pm 0,51 | 0,00 \pm 0,00 |
| 9 | 10,22 \pm 3,20 | 72,43 \pm 3,41 | 314,48 \pm 17,68 | 392,44 \pm 21,53 | 3,00 \pm 0,26 | 15,67 \pm 0,25 |
| 12 | 5,52 \pm 0,72 | 33,46 \pm 4,44 | 497,84 \pm 10,63 | 576,69 \pm 10,47 | 8,00 \pm 0,67 | 22,00 \pm 1,00 |
| 15 | 3,53 \pm 0,11 | 32,04 \pm 1,95 | 559,81 \pm 24,85 | 322,73 \pm 5,97 | 3,33 \pm 0,58 | 23,67 \pm 1,15 |

Tabela 6. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CIEBAQ observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada lacuna representa média \pm erro padrão da média (n=3, por dia, por grupo de tratamento).

| Dia | Espessura camada queratina (μm) | Espessura epiderme (μm) | Espessura derme (μm) | Espessura hipoderme (μm) | Número vasos | Número folículos pilosos |
|-----|--|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 3 | 3,75 \pm 0,62 | 15,83 \pm 0,82 | 368,95 \pm 33,72 | 143,98 \pm 29,63 | 1,00 \pm 0,00 | 26,50 \pm 0,78 |
| 6 | 3,03 \pm 0,55 | 16,37 \pm 0,48 | 327,47 \pm 0,35 | 148,44 \pm 37,29 | 4,33 \pm 0,15 | 12,67 \pm 2,66 |
| 9 | 3,40 \pm 0,52 | 14,81 \pm 0,41 | 236,32 \pm 10,96 | 212,13 \pm 13,80 | 1,50 \pm 0,07 | 12,50 \pm 1,06 |
| 12 | 3,35 \pm 0,11 | 16,18 \pm 0,27 | 340,09 \pm 83,56 | 173,93 \pm 23,24 | 4,33 \pm 0,38 | 18,67 \pm 0,98 |
| 15 | 3,78 \pm 0,69 | 14,75 \pm 0,21 | 337,52 \pm 11,61 | 227,08 \pm 24,17 | 4,33 \pm 0,58 | 15,67 \pm 3,32 |

Tabela 7. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo CILEBAQ observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada lacuna representa média \pm erro padrão da média (n=3, por dia, por grupo de tratamento).

| Dia | Espessura camada queratina (μm) | Espessura epiderme (μm) | Espessura derme (μm) | Espessura hipoderme (μm) | Número vasos | Número folículos pilosos |
|-----|--|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 3 | 3,17 \pm 0,05 | 18,75 \pm 0,46 | 221,69 \pm 19,14 | 121,28 \pm 2,25 | 6,00 \pm 0,28 | 26,50 \pm 0,11 |
| 6 | 5,28 \pm 0,28 | 21,21 \pm 1,35 | 244,07 \pm 21,63 | 174,96 \pm 22,12 | 4,33 \pm 0,58 | 8,00 \pm 0,30 |
| 9 | 5,40 \pm 0,77 | 19,03 \pm 3,25 | 325,36 \pm 19,31 | 339,10 \pm 11,96 | 4,67 \pm 0,25 | 22,33 \pm 1,23 |
| 12 | 3,74 \pm 0,29 | 14,25 \pm 1,77 | 347,12 \pm 5,11 | 271,36 \pm 7,34 | 6,67 \pm 0,62 | 24,00 \pm 0,78 |
| 15 | 4,39 \pm 1,42 | 12,41 \pm 0,52 | 439,70 \pm 21,84 | 277,20 \pm 16,35 | 3,67 \pm 0,15 | 26,33 \pm 1,58 |

Tabela 8. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo EBAQL observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com EBAQ. Cada lacuna representa média \pm erro padrão da média ($n=3$, por dia, por grupo de tratamento). A diferença estatística foi simbolizada por α $p<0,001$, β $p<0,01$, γ $p<0,05$ e * $p<0,01$, onde α : CN, β : CP, γ : EBAQSL e *: CILEBAQ.

| Dia | Espessura camada queratina (μm) | Espessura epiderme (μm) | Espessura derme (μm) | Espessura hipoderme (μm) | Número vasos | Número folículos pilosos |
|-----|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 11,69 \pm 0,46 α , β , γ^* | 71,69 \pm 4,59 α , γ^* | 378,20 \pm 23,53 α , β , γ^* | 152,00 \pm 8,46 β , γ^* | 10,00 \pm 0,00 α , β , γ^* | 1,50 \pm 0,21 α , β , γ^* |
| 6 | 7,98 \pm 0,76 α , β , γ^* | 69,59 \pm 3,45 α , γ^* | 417,85 \pm 13,81 α , β , γ^* | 414,92 \pm 14,65 α , β , γ^* | 4,87 \pm 0,21 α , β , γ^* | 8,00 \pm 0,46 β |
| 9 | 4,72 \pm 0,50 α , β , γ | 29,51 \pm 6,84 α , β , γ^* | 351,34 \pm 16,10 γ | 350,75 \pm 37,91 α , γ | 9,00 \pm 0,40 α , β , γ^* | 17,00 \pm 0,30 α , β^* |
| 12 | 4,12 \pm 1,24 α , β , γ | 28,95 \pm 6,88 α , β , γ^* | 394,96 \pm 26,71 β | 369,34 \pm 5,25 α , β , γ^* | 8,33 \pm 0,57 α , γ^* | 19,00 \pm 0,65 α , β , γ^* |
| 15 | 5,28 \pm 0,29 α , β , γ | 33,00 \pm 2,56 α , γ^* | 668,67 \pm 36,01 α , β , γ^* | 348,98 \pm 4,24 α , β , γ^* | 9,00 \pm 0,35 α , β , γ^* | 34,33 \pm 0,47 α , β , γ^* |

Tabela 9. Variação dos parâmetros microscópicos do grupo EBAQSL observados durante o estudo histológico da lesão dos animais, a cada 3 dias e durante os 15 dias do período experimental, através do modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com EBAQ. Cada lacuna representa média \pm erro padrão da média ($n=3$, por dia, por grupo de tratamento). A diferença estatística foi simbolizada por * $p<0,05$, onde *: CIEBAQ.

| Dia | Espessura camada queratina (μm) | Espessura epiderme (μm) | Espessura derme (μm) | Espessura hipoderme (μm) | Número vasos | Número folículos pilosos |
|------------|--|--|---|---|-------------------------|---|
| 3 | 4,60 \pm 0,13 * | 7,71 \pm 0,21 * | 207,08 \pm 7,90 * | 114,10 \pm 4,43 | 1,50 \pm 0,20 * | 19,00 \pm 0,20 * |
| 6 | 3,49 \pm 0,25 * | 8,73 \pm 0,21 * | 470,13 \pm 25,17 * | 133,91 \pm 4,41 | 4,33 \pm 0,40 | 21,33 \pm 2,80 * |
| 9 | 3,49 \pm 0,40 * | 9,08 \pm 0,52 * | 241,93 \pm 4,43 | 215,11 \pm 5,82 | 2,50 \pm 0,20 * | 17,50 \pm 0,64 * |
| 12 | 3,57 \pm 0,52 * | 10,63 \pm 0,19 * | 348,69 \pm 6,78 | 242,33 \pm 3,90 * | 5,00 \pm 0,20 | 27,33 \pm 2,14 * |
| 15 | 3,45 \pm 0,48 * | 13,62 \pm 0,38 * | 382,01 \pm 9,05 * | 287,78 \pm 6,22 | 4,67 \pm 0,20 | 24,00 \pm 4,00 |

Tabela 10. Resultados obtidos com o teste de correlação não-paramétrica de Spearman entre os parâmetros microscópicos do estudo histológico da lesão, bem como em relação ao conteúdo de hidroxiprolina, entre os grupos de tratamento (CN, CP, EBAQL e EBASL).

| Grupo | Parâmetros microscópicos | Valor de r | Valor de p |
|--------------|--|-------------------|-------------------|
| CN | Folículos pilosos e conteúdo de hidroxiprolina | +1,00 | 0,0083 |
| CN | camada de queratina e derme | -0,90 | 0,0417 |
| CP | camada de queratina e hipoderme | +0,90 | 0,0417 |
| CP | derme e número de folículos pilosos | +0,97 | 0,0083 |
| CP | derme e conteúdo de hidroxiprolina | +1,00 | 0,0083 |
| CP | número de folículos pilosos e conteúdo de hidroxiprolina | +0,97 | 0,0083 |
| CP | epiderme e derme | -1,00 | 0,0083 |
| CP | epiderme e conteúdo de hidroxiprolina | -0,90 | 0,0417 |
| EBAQL | camada de queratina e epiderme | +1,00 | 0,0083 |
| EBAQL | número de folículos pilosos e epiderme | +0,90 | 0,0417 |
| EBAQL | derme e número de folículos pilosos | +0,90 | 0,0417 |
| EBAQL | hipoderme e número de vasos | -0,97 | 0,0083 |
| EBAQSL | epiderme e hipoderme | +1,00 | 0,0083 |
| EBAQSL | número de vasos e número de folículos pilosos | +0,90 | 0,0417 |

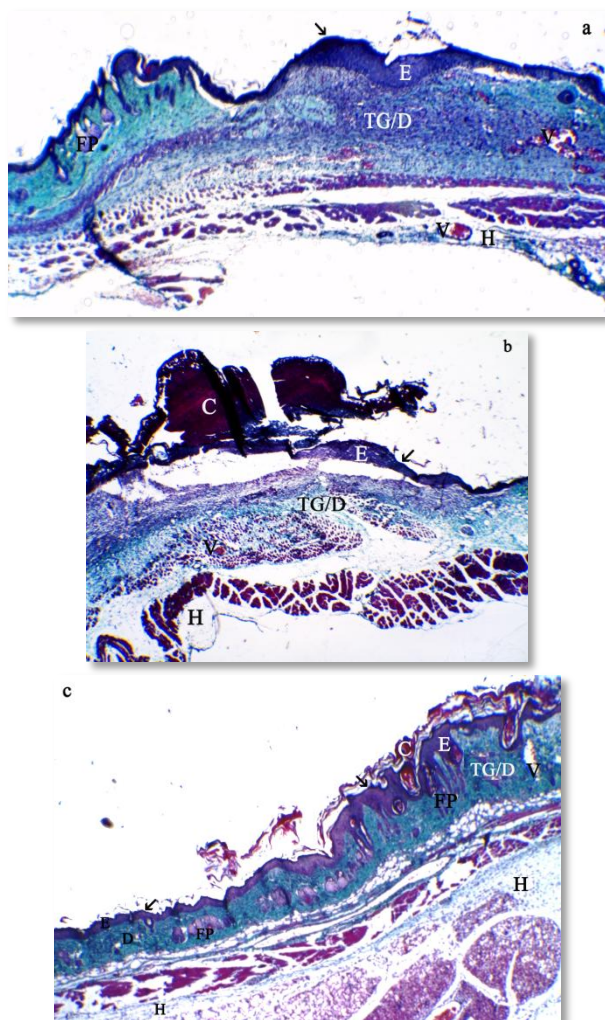


Figura 23. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 6 dias de tratamento. Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento), onde a = CN: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita; b = CP; c = EBAQL: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CILEBAQ) e epitélio granular à direita. Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x. C: crosta fibrino-leucocitária; →: camada de queratina; E: epiderme; TG: tecido de granulação; D: derme; H: hipoderme; V: vasos; FP: folículo piloso.

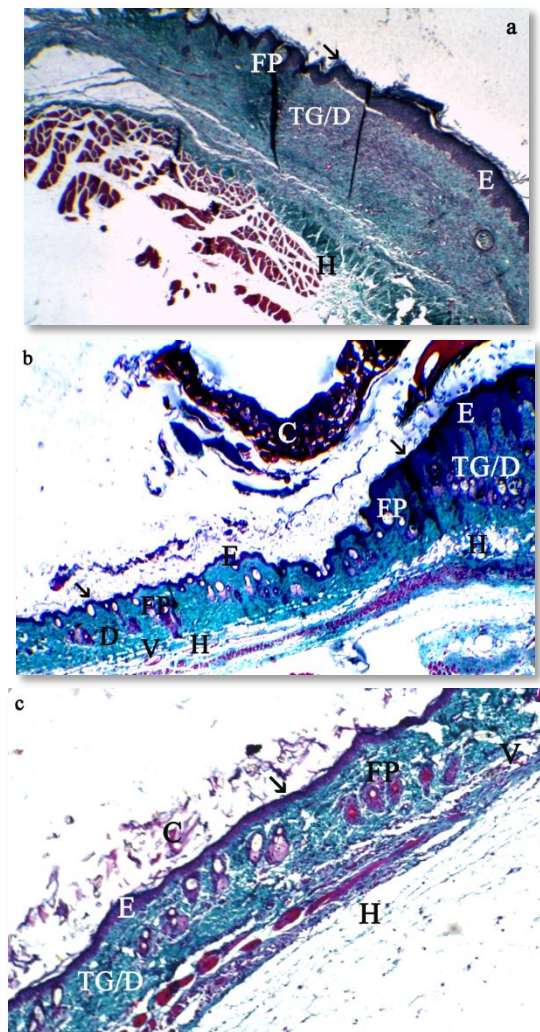


Figura 24. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 9 dias de tratamento. Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento), onde a = grupo controle negativo; b = grupo controle positivo: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita; c = grupo EBAQL. Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x. C: crosta fibrino-leucocitária; →: camada de queratina; E: epiderme; TG: tecido de granulação; D: derme; H: hipoderme; V: vasos; FP: folículo piloso.

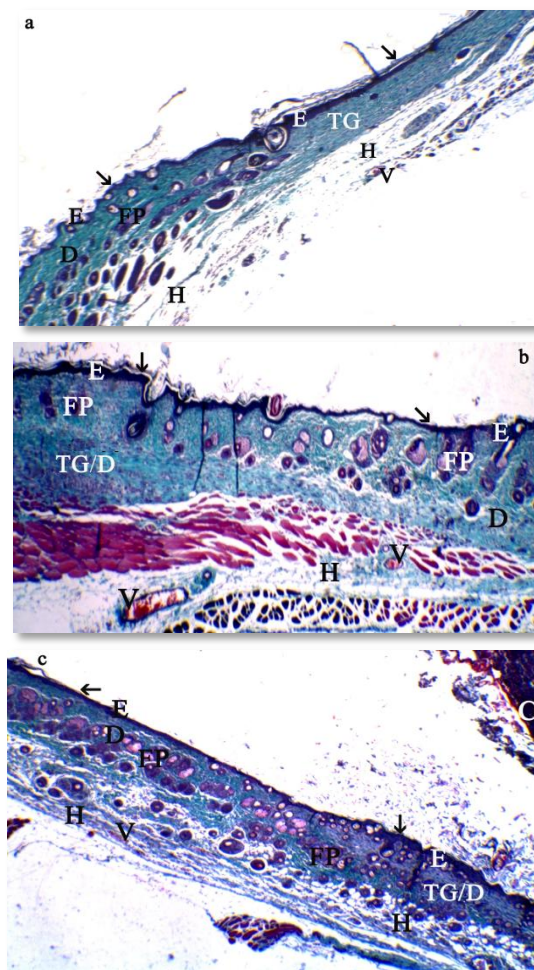


Figura 25. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 12 dias de tratamento. Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento), onde a = grupo controle negativo: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita; b = grupo controle positivo: tecido normal adjacente a lesão à direita (CI) e epitélio granular à esquerda; c = grupo EBAQL: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita. Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x. C: crosta fibrino-leucocitária; →: camada de queratina; E: epiderme; TG: tecido de granulação; D: derme; H: hipoderme; V: vasos; FP: folículo piloso.

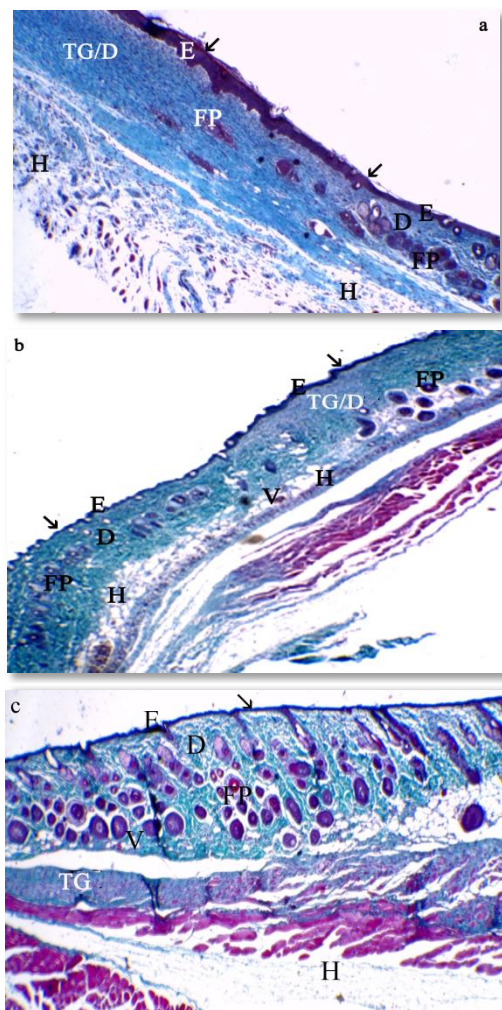


Figura 26. Fotomicrografia de corte histológico de pele dorsal de camundongo isogênico Balb/C dos grupos controle e de tratamento com EBAQ aos 15 dias de tratamento. Modelo de excisão (n=3, por dia, por grupo de tratamento), onde a = grupo controle negativo: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita; b = grupo controle positivo: tecido normal adjacente a lesão à direita (CI) e epitélio granular à esquerda; c = grupo EBAQL: tecido normal adjacente a lesão à esquerda (CI) e epitélio granular à direita. Coloração pelo método de Garvey's. Aumento de 40x. C: crosta fibrino-leucocitária; →: camada de queratina; E: epiderme; TG: tecido de granulação; D: derme; H: hipoderme; V: vasos; FP: folículo piloso.

A espessura da derme apresentou uma tendência de aumento durante o período cicatricial e, principalmente, aos 15 dias de tratamento nos grupos CN, CP e EBAQL (Tabelas 4, 5 e 8, respectivamente). A espessura média \pm erro padrão da média da camada dérmica do grupo CN correspondeu a $311,97 \pm 18,82 \mu\text{m}$, com variação entre $246,69 \pm 342,59 \mu\text{m}$; a do CP correspondeu a $420,6 \pm 20,82 \mu\text{m}$, com variação entre $242,55$ e $559,81 \mu\text{m}$; e a do EBAQL correspondeu a $442,20 \pm 23,23 \mu\text{m}$, com variação entre $351,34$ e $668,67 \mu\text{m}$.

No grupo CILEBAQ (Tabela 7) ficou evidente o aumento crescente da epiderme, que apresentou espessura média \pm erro padrão da média de $339,06 \pm 16,97 \mu\text{m}$, variando entre $221,69$ e $439,70 \mu\text{m}$. No grupo EBAQL (Tabela 9), a espessura média \pm erro padrão da média da derme foi de $360,69 \pm 11,36 \mu\text{m}$. Notou-se um aumento repentino aos 6 dias de tratamento, mas de maneira geral o espessamento foi progressivo ao longo do período experimental, variando entre $207,07$ e $470,13 \mu\text{m}$. No CIEBAQ (Tabela 6) a espessura média \pm erro padrão da média foi igual a $321,60 \pm 26,62 \mu\text{m}$ e manteve-se constante ao longo dos 15 dias de tratamento, exceto aos 9 dias. Assim, apresentou variação entre $236,32$ e $372,47 \mu\text{m}$.

Através dos resultados correspondentes as Tabelas 4 e 8, é possível afirmar que a espessura da derme do grupo EBAQL aumentou ao longo de todo o período experimental, em relação ao grupo CN. Porém, este aumento foi significativo somente aos 3 dias de tratamento, aos 6 dias e aos 15 dias ($p < 0,001$). Aos 9 dias e aos 12 dias de tratamento não foi observada diferença estatística.

Comparando o tratamento do grupo CP (Tabela 5) com o do grupo EBAQL (Tabela 8), foi visto que ocorreu um aumento significativo na espessura da camada dérmica no grupo EBAQL aos 3 dias, aos 6 dias e aos 15 dias de tratamento ($p < 0,01$). Aos 9 dias de tratamento também foi observado o aumento da espessura da derme nos animais do grupo EBAQL, todavia não foi observada diferença significativa. E aos 12 dias, observou-se um decréscimo significativo na espessura dessa camada no grupo EBAQL, em relação ao CP, com $p < 0,01$.

Quando estabelecida a relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL (Tabela 8) com o tecido dos animais do grupo EBAQL (Tabela 9), durante quase todo o período experimental foi observado o aumento significativo da espessura da derme ($p < 0,05$), exceto aos 12 dias de tratamento. Quando comparada ao grupo CILEBAQ (Tabela 7), a espessura da derme do grupo EBAQL (Tabela 8) aumentou durante todo o processo cicatricial. Contudo, houve

diferença significativa apenas aos 3 dias, aos 6 dias e aos 15 dias ($p < 0,01$). Assim, não foi observada diferença estatística aos 9 dias e aos 12 dias do período experimental. Relacionando o grupo EBAQSL (Tabela 9) e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), observou-se que a espessura da derme nos animais do grupo EBAQSL aumentou ao longo de boa parte do período cicatricial, sendo este significativo aos 6 dias e aos 15 dias de tratamento ($p < 0,05$); com exceção do período correspondente a 3 dias de tratamento, em que a espessura diminuiu significativamente ($p < 0,01$).

A espessura da hipoderme apresentou uma tendência de aumento, conforme observado na camada epidérmica, durante o período cicatricial nos grupos CP, EBAQL e EBAQSL (Tabelas 5, 8 e 9, respectivamente). Além disso, apresentou algumas oscilações aos 12 dias no CP e aos 6 dias no grupo EBAQL. A espessura média \pm erro padrão da média da camada hipodérmica do grupo CP correspondeu a $410,88 \pm 11,94 \mu\text{m}$, com variação entre 311,1 e $576,69 \mu\text{m}$; a do grupo EBAQL correspondeu a $327,20 \pm 14,10 \mu\text{m}$, com variação entre $151,99 \pm 414,92 \mu\text{m}$; e a do EBAQSL correspondeu a $219,78 \pm 5,09 \mu\text{m}$, com variação entre 114,1 e $287,78 \mu\text{m}$.

No grupo CN (Tabela 4) a espessura média \pm erro padrão da média foi igual a $211,49 \pm 13,12 \mu\text{m}$, a qual manteve-se relativamente constante ao longo dos 15 dias do processo cicatricial, apresentando variação entre 189,84 e $269,24 \mu\text{m}$.

Nos grupos controles internos CIEBAQ (Tabela 6) e CILEBAQ (Tabela 7) ficou evidente o aumento crescente da espessura da hipoderme, exceto aos 9 dias de tratamento, que apresentou espessura média \pm erro padrão da média de $190,396 \pm 24,63 \mu\text{m}$ e $265,65 \pm 14,44 \mu\text{m}$, respectivamente. A variação ficou entre 148,44 e $227,08 \mu\text{m}$ no CIEBAQ e entre 121,27 e $339,10 \mu\text{m}$ no CILEBAQ.

Com base nas Tabelas 4 e 8, observou-se que a espessura da hipoderme do grupo EBAQL aumentou significativamente a partir dos 6 dias de tratamento e até o fim do período experimental, em relação ao grupo CN ($p < 0,001$). Aos 3 dias de tratamento, ocorreu uma diminuição da espessura no tecido dos animais do grupo EBAQL, mas não houve diferença significativa em relação ao grupo CN.

Comparando o tratamento do grupo EBAQL (Tabela 8) com o do grupo CP (Tabela 5), foi visto que ocorreu um aumento significativo na espessura da camada hipodérmica no grupo EBAQL aos 6 dias e aos 15 dias de tratamento ($p < 0,01$). Nos demais intervalos de tempo, foi observada uma diminuição na espessura da hipoderme nos animais do grupo EBAQL, essa que foi significativa aos 3 dias e aos 12 dias

($p < 0,01$) do período experimental; e aos 9 dias não foi observada diferença estatística significativa.

Estabelecida uma relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL (Tabela 8) com o tecido dos animais do grupo EBAQSL (Tabela 9), foi observado que durante todo o processo cicatricial aumentou significativamente a espessura da hipoderme ($p < 0,05$). Quando comparada ao grupo CILEBAQ (Tabela 7), a espessura da hipoderme do grupo EBAQL aumentou durante todo o processo cicatricial. Contudo, houve diferença significativa aos 3, 6, 12 e aos 15 dias ($p < 0,01$). Portanto, não foi observada diferença estatística aos 9 dias do período experimental.

Quando comparados os grupos EBAQSL (Tabela 9) e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), notou-se que a espessura da hipoderme nos animais do grupo EBAQSL aumentou aos 9 dias e aos 12 dias de tratamento. Este aumento foi significativo apenas aos 12 dias ($p < 0,05$) do período experimental. Nos outros períodos de tratamento, correspondentes a 3 dias, 6 dias e 15 dias do processo cicatricial, ocorreu uma diminuição da espessura da camada hipodérmica. Porém, não foi observada diferença significativa em relação ao CIEBAQ.

O número de folículos pilosos mostrou uma tendência de aumento durante todo período cicatricial nos grupos CN, CP e EBAQL (Tabelas 4, 5 e 8, respectivamente). A média \pm erro padrão da média neste número no grupo CN foi $10,55 \pm 1,03$ unidades, variando entre 0 e 12,33. No grupo CP, o número médio \pm erro padrão da média de folículos pilosos foi de $15,33 \pm 0,60$ unidades, com variação entre 0 e 23,67 unidades. No grupo EBAQL, o número de folículos pilosos variou entre 1,5 e 34,33 unidades, tendo sido observado um número médio \pm erro padrão da média correspondente a $15,96 \pm 0,42$ unidades.

De maneira geral, o número de folículos pilosos manteve-se constante nos grupos CIEBAQ e CILEBAQ (Tabelas 6 e 7, respectivamente), bem como no grupo EBAQSL (Tabela 9). No grupo CIEBAQ, observou-se um número elevado de folículos pilosos após 3 dias de tratamento. Nos períodos subsequentes este número diminuiu e, então, manteve-se constante. O número médio \pm erro padrão da média de folículos pilosos foi de $14,87 \pm 2,00$ unidades, variando entre 12,5 e 26,5 unidades. No grupo CILEBAQ, o número médio \pm erro padrão da média de folículos pilosos correspondeu a $24,22 \pm 1,20$ unidades, com variação entre 8,00 e 26,33 unidades. Notou-se que apenas aos 6 dias de tratamento ocorreu uma diminuição no número de folículos pilosos, apesar deste número ser constante ao longo dos demais períodos de

tratamento. No grupo EBAQSL, o número médio \pm erro padrão da média de folículos pilosos foi igual a $22,54 \pm 2,39$ unidades, e apresentou uma variação entre 17,5 e 27,33 unidades.

Observou-se que a quantidade de folículos pilosos do grupo EBAQL (Tabela 8) aumentou significativamente ao longo de todo o processo de cicatrização, quando comparada a quantidade destes anexos epidérmicos presente no tecido dos animais do grupo CN ($p < 0,001$ - Tabela 4).

Comparando o tratamento do grupo EBAQL (Tabela 8) com o do grupo CP (Tabela 5), observou-se que ocorreu um aumento significativo no número de folículos pilosos no grupo EBAQL aos 3, 6, 9 e aos 15 dias de tratamento ($p < 0,01$). Nos período correspondente a 12 dias de tratamento, foi observada uma diminuição no número de folículos pilosos, essa que foi estatisticamente significativa apresentando um valor de $p < 0,01$.

Estabelecida a relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL (Tabela 8) com o tecido dos animais do grupo EBAQSL (Tabela 9), foi observado que o número de folículos pilosos aumentou significativamente durante os 6 dias e os 15 dias ($p < 0,05$) do processo cicatricial. Nos demais períodos observou-se uma diminuição significativa no número deste anexo epitelial aos 3 dias e aos 12 dias ($p < 0,05$) do processo cicatricial. Portanto, não foi observada diferença estatística significativa no grupo EBAQL aos 9 dias de tratamento, em relação ao grupo EBAQSL.

Quando comparados os grupos EBAQSL (Tabela 9) e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), notou-se que o número de folículos pilosos no tecido dos animais do grupo EBAQSL aumentou aos 6, 9, 12 e 15 dias de tratamento. Este aumento foi significativo somente aos 6, 9 e 12 dias do período experimental ($p < 0,05$). Nos primeiros 3 dias do período experimental, ocorreu uma diminuição significativa na quantidade de folículos pilosos ($p < 0,05$).

O número de vasos sanguíneos, entre eles artérias e/ou veias, apresentou-se de maneira relativamente constante nos grupos CN e CP (Tabelas 4 e 5, respectivamente); com exceção ao período de 9 dias do processo cicatricial no grupo CN, e ao período de 12 dias no grupo CP, em que foi observado o aumento no número de artérias e/ou veias no tecido epitelial. No grupo CN, o número médio \pm erro padrão da média no número de vasos foi $5,78 \pm 0,31$ unidades, variando entre 4,67 e 7,33 unidades. No grupo CP, o número médio \pm erro padrão da média no número de vasos foi $4,46 \pm 0,50$ unidades, variando entre 2,00 e 8,00 unidades.

No grupo EBAQL (Tabela 8), o número de vasos manteve-se relativamente elevado durante o período cicatricial, exceto aos 6 dias do mesmo em que foi observado um decréscimo neste número. A média \pm erro padrão da média foi igual a $8,24 \pm 0,31$ artérias e/ou veias, com variação entre 4,87 e 10,00 unidades.

Não foi observado um perfil marcante nos grupos CIEBAQ (Tabela 6), CILEBAQ (Tabela 7) e no grupo EBAQSL (Tabela 9) quanto ao número de vasos. A média \pm erro padrão da média neste número no grupo CIEBAQ foi $3,63 \pm 0,29$, variando entre 1 e 4,33. No grupo CILEBAQ, o número médio \pm erro padrão da média de artérias e/ou veias foi de $5,00 \pm 0,34$, com variação entre 3,67 e 6,67. No grupo EBAQSL, o número de vasos variou entre 1,5 e 5,00, tendo sido observado um número médio \pm erro padrão da média correspondente a $4,13 \pm 0,25$.

De acordo com a Tabela 8, pode-se afirmar que a quantidade de artérias e/ou veias no tecido epitelial do grupo EBAQL aumentou ao longo de todo o período de cicatrização, quando comparada a quantidade dessas estruturas presente no tecido dos animais do grupo CN (Tabela 4). Todavia, foi observada diferença estatística significativa aos 3, 9, 12 e aos 15 dias ($p < 0,05$) do processo cicatricial. Não foi observada diferença estatística aos 6 dias de tratamento com o extrato, em relação ao controle negativo.

Comparando o tratamento do grupo EBAQL (Tabela 8) com o do grupo CP (Tabela 5), observou-se que também ocorreu um aumento no número de vasos ao longo de todo o período no grupo EBAQL. Porém, a diferença estatística foi significativa aos 3, 6, 9 e aos 15 dias de tratamento ($p < 0,05$). No período correspondente a 12 dias não foi observada diferença estatística significativa.

Estabelecida a relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL (Tabela 8) com o tecido dos animais do grupo EBAQSL (Tabela 9), notou-se que o número de vasos aumentou significativamente durante os 3, 9, 12 e 15 dias do processo cicatricial ($p < 0,05$). No período equivalente a 6 dias de tratamento, foi observado o aumento no número de vasos no tecido do grupo EBAQL, o qual não foi significativo em relação ao observado no grupo EBAQSL.

Quando comparados os grupos EBAQSL (Tabela 9) e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), notou-se que o número de artérias e/ou veias no tecido dos animais do grupo EBAQSL aumentou aos 3 dias, aos 9 dias, aos 12 dias e aos 15 dias de tratamento. Este aumento foi significativo somente aos 3 e aos 9 dias ($p < 0,05$) do período experimental. Aos 6 dias do período cicatricial, o número de

vasos foi semelhante nos grupos EBAQSL e CIEBAQ, portanto não foi observada diferença estatística. E observou-se, ainda, que o aumento no número de vasos aos 12 dias e aos 15 dias do período cicatricial não foi significativo.

Através do teste de correlação não-paramétrica de Spearman entre os parâmetros microscópicos de estudo (camada de queratina, epiderme, derme, hipoderme, número de folículos pilosos, número de vasos e conteúdo de hidroxiprolina) dos grupos CN, CP, CIEBAQ, CILEBAQ, EBAQL e EBAQSL, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 10. Considerou-se o valor de p bicaudal e assumiu-se um intervalo de confiança equivalente a 95 %.

Entre os parâmetros microscópicos do grupo CN foi observada uma correlação positiva entre o número de folículos pilosos e o conteúdo de hidroxiprolina ($r=1$, $p=0,0083$). E somente uma correlação negativa entre a camada de queratina e a derme ($r=-0,9$, $p=0,0417$), a qual mostrou-se estatisticamente significativa.

Aplicando o teste estatístico aos parâmetros microscópicos do grupo CP, foram observadas correlações positivas e estatisticamente significativas entre a camada de queratina e a hipoderme ($r=0,9$, $p=0,0470$), entre a derme e o número de folículos pilosos ($r=0,9747$, $p=0,0083$), entre a derme e conteúdo de hidroxiprolina ($r=1$, $p=0,0083$) e entre o número de folículos pilosos e o conteúdo de hidroxiprolina ($r=0,9747$, $p=0,0083$). Além disso, observou-se correlação negativa significativa entre a epiderme e a derme com valor de $r=-1$, e $p=0,0083$ e entre a epiderme e conteúdo de hidroxiprolina ($r=-0,9$, $p=0,0417$).

Foram observadas correlações positivas e estatisticamente significativas entre algumas dos parâmetros microscópicos do grupo EBAQL, como a camada de queratina e a epiderme ($r=1$, $p=0,0083$), o número de folículos pilosos e a epiderme ($r=0,9$, $p=0,0417$) e a derme e o número de folículos pilosos ($r=0,9$, $p=0,0417$). Foi observada também uma correlação negativa entre a hipoderme e o número de vasos ($r=-0,9747$, $p=0,0083$). No grupo EBAQSL, foi observada correlação positiva estatisticamente significativa entre a epiderme e a hipoderme, com valor de $r=1$ e $p=0,0083$; bem como entre o número de vasos e o número de folículos pilosos, com valor de $r=0,9$ e $p=0,0417$.

Nos demais grupos experimentais não foram observadas correlações estatisticamente significativas, quando analisadas os parâmetros microscópicos do estudo histológico da lesão, assim como o conteúdo de hidroxiprolina.

5.3. Atividade antitumoral

5.3.1. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Para investigar o efeito citotóxico do tratamento com extrato bruto aquoso (EBAQ), EBHE (extrato bruto hidroetanólico) e extrato derivado de extração supercrítica (ESC) foi utilizado o ensaio do MTT. Neste experimento, a incubação das células de TAE, retiradas do camundongo após 9 dias da sua inoculação no animal, com concentrações crescentes de EBAQ, por 24 horas, reduziu significativamente a viabilidade celular em até 81 % (60; 71 e 81 %, para 125, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). A CI 50 para o EBAQ foi de 153 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27).

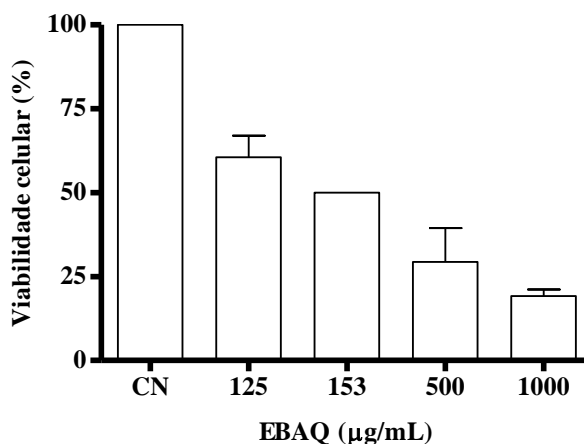


Figura 27. Efeito do EBAQ de casca de banana *Musa spp.* sobre a viabilidade celular em células de TAE. No ensaio de viabilidade celular (teste do MTT), 5×10^6 células de TAE foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 horas as células foram incubadas com concentrações crescentes de EBAQ por 24 horas (31,25 - 1000 $\mu\text{g/mL}$; 37°C; 5 % CO_2). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, $n=3$.

Concentrações crescentes de EBHE e de extrato derivado de ESC, por 24, 48 e 72 horas não foram capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular, quando comparados ao controle negativo (CN). Curiosamente, os resultados apresentados na Tabela 2 referente ao item 5.1. *Determinação de galocatequina em extratos de casca de banana Musa spp por cromatografia líquida de alta eficiência*

(CLAE), apontaram um maior conteúdo de galocatequina no EBHE, seguido do EBAQ e do extrato derivado de ESC.

O EBHE não apresentou atividade relevante no ensaio de citotoxicidade *in vitro* e, diante disso, não foi aplicado ao modelo *in vivo* para avaliação de atividade antitumoral.

O extrato derivado de ESC apesar de não ter mostrado citotoxicidade *in vitro*, apresentou elevada toxicidade quando aplicado no modelo de excisão em camundongo para avaliação do potencial cicatrizante de um composto. E, por isso, o extrato derivado de ESC foi selecionado para os ensaios da atividade antitumoral *in vivo*.

5.3.2. Avaliações morfohistocitológicas

Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral expressos na Tabela 11 demonstram que o EBAQ apresentou significativa atividade quando comparado ao CN, uma vez que foi capaz de diminuir cerca de 67 % do ganho de peso ($p=0,0017$). Além disso, foi capaz de aumentar em torno de 4 vezes a proporção do número de células inviáveis em relação às células tumorais viáveis e aumentar cerca de 23 % a taxa média de sobrevida dos animais tratados com EBAQ e portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Foi observado também um aumento relevante na porcentagem média de sobrevida, que correspondeu a 19 % nos animais tratados com EBAQ.

O ESC (Tabela 12) apresentou significativa atividade em relação ao CN, pois reduziu em 79 % o ganho de peso ($p<0,0001$). E, ainda, foi capaz de dobrar a proporção do número de células inviáveis em relação às células tumorais viáveis, bem como aumentar cerca de 22 % a taxa média de sobrevida dos animais tratados portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Comparando os grupos testes (EBAQ e ESC), observou-se que não houve diferença significativa em relação aos parâmetros histocitológicos. Entretanto, os animais do grupo teste tratados com EBAQ apresentaram maior proporção do número de células inviáveis em relação às células tumorais viáveis quando comparados com os animais do grupo ESC. A taxa média de sobrevida dos animais tratados com ESC, bem como a porcentagem média de sobrevida foram relativamente maiores em relação aos animais do grupo EBAQ (em torno de 3 % e 20 %, respectivamente) (Tabelas 11 e 12).

E, finalmente, é importante notar que o tratamento dos animais com EBAQ, assim como com ESC foram significativamente efetivos na diminuição do TAE uma vez que foram capazes de inibir em

aproximadamente 57 % e 49 %, respectivamente, o crescimento do tumor ascítico (Figura 28).

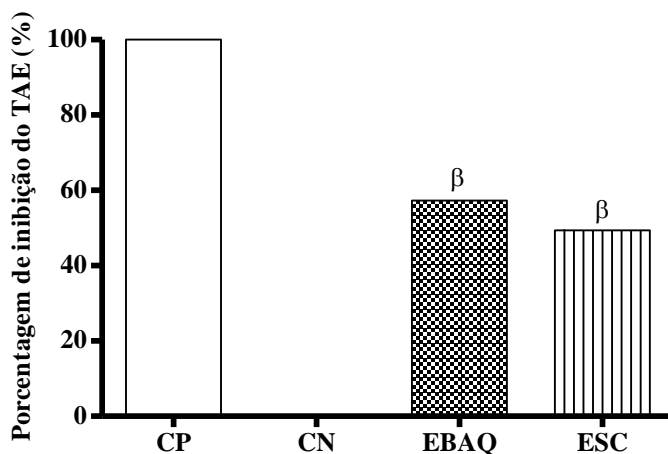


Figura 28. Percentagem de inibição do TAE referente ao tratamento com EBAQ e ESC de casca de banana *Musa spp.* (150 mg/kg, respectivamente). Os resultados foram expressos em porcentagens, n=6. A diferença estatística foi simbolizada por β $p < 0,05$, onde β : CP.

Tabela 11. Parâmetros morfohistocitológicos que caracterizam potencial atividade antitumoral do EBAQ. Onde, TMS: taxa média de sobrevivência e PAL: porcentagem média de sobrevivência. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, n=6. A diferença estatística foi simbolizada por α , * $p < 0,05$, onde α : CN e *: EBAQ em relação ao ESC.

| Grupo | Δ Peso (g) | Vol .liq (mL) | Vol .cel (mL) | Vol.cel/vol.liq | Prop i/v | TMS (dia) | PAL (%) |
|---------------|--|---|---|-----------------|--|-----------------------------------|---------|
| CN (salina) | 12,18 \pm 1,70 | 12,73 \pm 1,33 | 2,21 \pm 0,49 | 0,1736 | 0,0100 | 13 | 0 |
| C Normal | 3,30 \pm 0,90 | ----- | ----- | ----- | ----- | 30 | 100 |
| CP (doxo) | 2,20 \pm 0,80 | ----- | ----- | ----- | ----- | 30 | 100 |
| EBAQ 150mg/kg | 4,02 \pm 0,89 ^{α} | 5,50 \pm 0,71 ^{α*} | 1,60 \pm 0,14 ^{α*} | 0,2909 | 0,0461 ^{α*} | 16 ^{α} | 18.52 |

Tabela 12. Parâmetros morfohistocitológicos que caracterizam potencial atividade antitumoral do extrato derivado da ESC. Onde, TMS: taxa média de sobrevida e PAL: porcentagem média de sobrevida. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, n=6. A diferença estatística foi simbolizada por α ,* $p < 0,05$, onde α : CN e *: ESC em relação ao EBAQ.

| Grupo | Δ Peso (g) | Vol. liq (mL) | Vol .cel (mL) | Vol.cel/vol.liq | Prop i/v | TMS (dia) | PAL (%) |
|-----------------|--|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------|
| CN (DMSO) | 10,45 \pm 1,13 | 10,40 \pm 0,75 | 3,25 \pm 1,70 | 0,3125 | 0,0085 | 13,5 | 0 |
| C Normal | 1,08 \pm 0,99 | ----- | ----- | ----- | ----- | 30 | 100 |
| CP (doxo) | 2,20 \pm 0,80 | ----- | ----- | ----- | ----- | 30 | 100 |
| ESC 150mg/kg | 2,20 \pm 0,22 ^{α} | 7,73 \pm 1,43 | 2,55 \pm 0,73 | 0,3299 | 0,0233 ^{α} | 16,5 ^{α} | 22,22 |

6. Discussão

6.1. Métodos de extração e determinação de galocatequina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A banana é uma das frutas mais populares no mercado mundial de alimentos. Sabe-se que estas frutas em geral contêm vários compostos antioxidantes, como vitamina C, vitamina E e β -caroteno (KANAZAWA; SAKAKIBARA, 2000; PAUL; SOUTHGATE, 1978). Sua capacidade antioxidante também pode ser devida a outros grupos de compostos, como os flavonóides. Dados obtidos por Someya, Yoshiki e Okubo (2002) em estudo sobre a composição antioxidante das bananas provenientes da República das Filipinas, localizada no sudeste da Ásia, apontaram para a identificação majoritária do flavonóide galocatequina, presente em maior quantidade nas cascas de banana em relação à polpa da fruta. Dessa maneira, no presente trabalho se optou pela quantificação do flavonóide galocatequina como um possível fitomarcador para os ensaios bioguiados de atividade antioxidante, cicatrizante e antitumoral dos extratos da casca da banana Musa spp.

Levando em consideração a metodologia empregada no presente trabalho (item 3.1.3.1. *Extrações convencionais utilizando solventes orgânicos*), e os resultados expressos na Tabela 2, o fato do EBHE

apresentar um maior conteúdo do composto fenólico galocatequina, em relação ao EBAQ, corrobora outros achados da literatura científica. A respeito do extrato derivado da ESC, acredita-se que a adição de um co-solvente, como o etanol, ao processo poderia ser interessante no sentido de aumentar a extração de compostos fenólicos e, conseqüentemente, suas atividades biológicas no que diz respeito a atividade antioxidante. Em relação à atividade cicatrizante, seria necessário a realização de um estudo mais detalhado da composição química do ESC, principalmente, no que diz respeito a sua composição fitotóxica. E, além disso, verificar a presença de contaminantes de elevada toxicidade como os defensivos agrícolas, uma vez que este produto apresentou elevada toxicidade mesmo em modelo de aplicação cutânea, o que levou a morte dos animais em um curto período de tratamento.

Observando o perfil cromatográfico dos extratos de casca de *Musa spp.* (Figura 12), notou-se que o pico de galocatequina indicado não corresponde ao constituinte majoritário deste material. Acredita-se que o pico de absorção no tempo de retenção próximo de 4 (quatro) minutos pode ser decorrente da presença do composto epigalocatequina. E que o pico menor, à sua direita e entre os tempos de retenção 4 (quatro) e 5 (cinco) minutos, provavelmente está relacionado a presença de material glicosilado ou de natureza lipídica.

Embora os ensaios biológicos de atividade cicatrizante e antitumoral tenham sido promissores, o reconhecimento da composição química completa dos extratos ora aplicados é essencial para que seja possível estabelecer uma relação entre essa última e a atividade biológica observada. Acredita-se que as potenciais atividades terapêuticas dos extratos de casca de *Musa spp.* analisadas estão diretamente relacionadas ao sinergismo entre os componentes presentes nos extratos.

A atual legislação brasileira exige que para o registro de um produto fitoterápico se faça a padronização dos extratos, procedendo simultaneamente com as análises qualitativas e quantitativas do material vegetal e que seja especificado o teor de uma substância ou de um grupo de substâncias denominadas marcadores (BRASIL, 2004). Dessa forma, fica evidente que a identificação química de uma espécie vegetal baseada apenas no isolamento e identificação estrutural de seus componentes não é suficiente e adequada às atuais condições exigidas pela Ciência e que resultem em produtos manufaturados.

Uma forma de praticar as exigências apresentadas é empregar o uso de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria. Essas técnicas permitem uma rápida

caracterização da composição do material vegetal em estudo através da identificação dos tempos de retenção e de suas propriedades espectrofotométricas, as quais estão associadas às características intrínsecas de cada substância, como a polaridade, entre outros (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; ARDREY, 2003). A resposta obtida através deste método permite a identificação de metabólitos secundários, aliada a uma técnica de calibração, a partir de uma substância padrão. Assim, é possível a construção de uma curva padrão e, conseqüentemente a quantificação das substâncias investigadas (ROBARDS, 2003).

Outro ponto importante do desenvolvimento de um método de análise é o preparo da amostra. No caso de plantas medicinais, este passo é fundamental pelo elevado número de constituintes presentes em uma preparação vegetal que podem interferir na seletividade do método e, no caso do CLAE, diminuir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica. Além disso, deve-se garantir a total dissolução da amostra no solvente no qual a mesma será injetada no equipamento. A dissolução incompleta ou utilização de solvente muito polar pode resultar em distorção dos picos na análise por CLAE ou em bloqueio na passagem da luz em análises em espectrofotômetro ao UV (HONG; SHAH, 2000).

A quantidade da substância a ser analisada/amostra pode ser obtida por comparação do sinal obtido com aquele de um padrão interno ou externo. No caso da utilização de padrão externo, este é a própria substância a ser analisada, na forma pura, com a qual é elaborada uma curva de calibração, essencial para se determinar a linearidade tanto de métodos que utilizem CLAE quanto espectrofotômetro no UV. Quando da análise por CLAE, existe a opção de se utilizar um padrão interno em uma quantidade conhecida de uma substância que é adicionada a própria amostra. Trata-se de uma substância não presente na amostra, que forneça um pico completamente separado dos demais e que seja adicionado em quantidade tal que forneça um pico de área ou altura semelhante ao fornecido pelo analito permitindo a comparação quantitativa entre eles (CIOLA, 1998). No presente trabalho, a análise quantitativa foi realizada através da comparação com padrão externo. Os resultados obtidos com a curva de calibração foram utilizados na determinação da equação a ser utilizada no cálculo da porcentagem de galocatequina. Portanto, a análise por CLAE permite que a porcentagem relativa da substância detectada seja calculada.

A análise cromatográfica por CLAE dos produtos derivados de extrações convencionais e supercríticas na casca da banana realizadas no

presente trabalho demonstrou um maior teor de galocatequina no extrato EBHE, seguido do EBAQ e finalmente o extrato derivado da ESC (Tabela 2). O EBHE apresentou em torno de 37 % mais galocatequina em relação ao conteúdo deste flavonóide presente no EBAQ e 73% mais que no extrato obtido na ESC.

São vários os processos existentes para extração de compostos biologicamente ativos. Os métodos clássicos ou as operações consideradas convencionais, tais como o arraste a vapor e a maceração seguida de fracionamento com solventes orgânicos são, geralmente, pouco seletivos. E, em muitos casos, responsáveis pela degradação de componentes termolábeis, além da contaminação dos extratos com resíduos de solvente e, conseqüentemente, seus efeitos tóxicos. Em geral, essas técnicas também causam dificuldades na análise fitoquímica dos extratos devido à presença do solvente e de compostos indesejáveis no soluto, bem como a degradação do produto durante a separação da mistura. Também, o rendimento da extração e o potencial antioxidante dos extratos dependem do tipo de solvente, devido às diferenças nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997).

Por outro lado, a competitividade na produção de compostos com atividade biológica que, pela conquista de mercados, se fundamenta na qualidade, disponibilidade, sustentabilidade ambiental e baixo custo. A extração supercrítica (ESC) se destaca por minimizar danos ao meio ambiente e primar pela qualidade do produto ao aumentar a seletividade dos grupos de compostos de interesse a serem extraídos. Apesar da utilização da ESC nem sempre estar associada a baixos custos de produção esta técnica vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (KHAJEH et al., 2004).

Cabe ressaltar que a galocatequina é um composto polar e, por isso, tem maior afinidade por solventes polares. Assim, justifica-se um maior conteúdo deste flavonóide nos extratos obtidos através dos métodos de extração convencionais utilizando água quente (para obtenção do EBAQ) e uma mistura de álcool e água (para obtenção do EBHE). Por outro lado, a extração supercrítica tende a extrair compostos apolares, sendo assim observado um menor conteúdo de galocatequina no produto final da ESC. Dessa forma, para se obter um melhor rendimento específico deste flavonóide seria interessante a utilização de um co-solvente, como por exemplo, o etanol, com o objetivo de aumentar e melhorar sua capacidade de arraste de compostos polares. Outra alternativa, para aumentar a eficiência do processo de extração de

galocatequina, poderia ser a elevação da pressão de CO₂ no sistema acompanhada ou não da adição de um co-solvente.

A fim de melhorar a eficiência da extração de compostos antioxidantes pelo processo de ESC, a partir do bagaço da uva proveniente da produção de vinho Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*), Campos et al. (2008) utilizaram co-solvente, pois as substâncias que apresentam atividade antioxidante em geral são de natureza polar. A partir dos resultados de extrações por métodos convencionais de baixa pressão, o etanol foi selecionado como um co-solvente adequado para a extração por ESC, com o objetivo de aumentar a solubilização de componentes polares. O rendimento da ESC com o CO₂ puro foi de 2,7% p/p, já o uso do etanol 15 % como co-solvente no processo de ESC elevou o rendimento para até 9,2% p/p. Entretanto, é importante ressaltar que na avaliação quantitativa da eficiência do processo de ESC, os valores de produtividade não estão diretamente relacionados com a sua eficiência qualitativa. Conseqüentemente, é importante avaliar a perfil químico e atividade biológica dos extratos.

Luengthanaphol et al. (2004) compararam o rendimento e a atividade antioxidante de extratos de sementes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) extraídos através da técnica de ESC e ESC com co-solvente etanol 10%. Os pesquisadores verificaram baixo rendimento na extração com fluido supercrítico, porém a adição do co-solvente aumentou significativamente a extração dos compostos bioativos, tornando os extratos mais efetivos quanto as suas propriedades antioxidantes.

Li e Hartland (1992) reportaram a influência de um co-solvente na extração supercrítica de xantinas (cafeína e teobromina) e de gordura das sementes de cacau. O estudo indica que alterando apenas a densidade do gás carbônico, variando pressão e temperatura, temos um efeito limitado no aumento da solubilidade do gás carbônico. A adição de um co-solvente pode aumentar o poder de seletividade e aumentar as aplicações da extração supercrítica. Neste estudo, ocorreu um aumento da solubilidade da teobromina na presença de etanol como co-solvente. O mesmo estudo reporta, ainda, que o etanol em uma mistura com o gás carbônico em condições supercríticas, forma um sistema de duas substâncias que são miscíveis em todas as proporções.

O etanol tem se mostrado um co-solvente muito útil para ser utilizado na extração supercrítica. O extrato final pode ser utilizado em alimentos ou formulações farmacêuticas sem a preocupação de separar o extrato de um co-solvente que não possa ser consumido por humanos (LI; HARTLAND, 1992). Devido ao aumento no rendimento de

extração de polifenóis, com a inclusão do etanol como co-solvente, alguns estudos foram direcionados exclusivamente para a extração de determinados flavanóides utilizando-se o etanol. A solubilidade das catequinas, em gás carbônico supercrítico aumenta com o aumento da porcentagem de etanol adicionado ao sistema (BERNA et al., 2001).

A ESC é uma técnica alternativa de extração e tem sido empregada para a obtenção de extratos de alto valor agregado a partir de plantas e diversos produtos naturais, tanto na área acadêmica como industrial, especialmente nos setores de alimentos, fármacos e cosméticos (ZANCAN et al., 2002; QUISPE-CONDORI et al., 2005; DANIELSKI; MICHIELIN; FERREIRA, 2007). A obtenção de compostos antioxidantes mediante extração com gases, como o dióxido de carbono, sob condições críticas de pressão e temperatura constitui método moderno e eficiente (POKORNY; KORCZAC, 2001). A ESC emprega gases pressurizados como solventes e se diferencia das outras técnicas pela produção de extratos isentos de solvente e sem degradação térmica, além de permitir o fácil controle da seletividade do processo, aspecto relevante para sua utilização industrial (ZANCAN et al., 2002; DANIELSKI; MICHIELIN; FERREIRA, 2007).

O aumento dos riscos à saúde e da contaminação ambiental, associados ao uso de solventes químicos nos processos de extração de óleos essenciais para o consumo humano, têm colocado novas exigências sobre os alimentos, cosméticos e produtos da indústria farmacêutica a respeito do emprego de tecnologias limpas a fim de fornecer produtos de alta qualidade para o mercado global. As novas exigências que regulamentam o uso de solventes químicos em todo o mundo, motivadas pelas preocupações sanitárias e ambientais, culminaram na necessidade de atividades de pesquisa na busca de novas tecnologias. Desta forma, os fluidos supercríticos são os solventes mais comumente utilizados nos processos de extração de óleos essenciais derivados de produtos naturais. Particularmente, a ESC com CO₂ é vista como uma técnica “limpa” e, por isso, compatível com o meio ambiente, além de apresentar propriedades úteis para uma ampla gama de processos químicos e bioquímicos (SALGIN, 2007).

Haja vista as propriedades relevantes da ESC, essa técnica de extração também foi aplicada no presente trabalho no intuito de obter-se um extrato de casca de banana livre da presença de solventes que pudessem intervir na sua composição, bem como evitar a geração de resíduos químicos provenientes do processo de extração. E, além disso, avaliar o seu desempenho e a sua eficácia terapêutica em relação aos extratos obtidos por métodos de extração convencional.

Por outro lado, a extração convencional com solventes orgânicos e água é frequentemente utilizada para o isolamento de compostos bioativos. Neste caso, etanol e água são os solventes mais empregados para a extração de antioxidantes por razões de fitoquímicas, higiene e de abundância. Entretanto, solventes com menor polaridade, como o acetato de etila, normalmente extraem compostos com maior atividade antioxidante que a mistura com etanol ou metanol, ou somente metanol (TSUDA et al., 1994).

Jung et al. (2006), em trabalho realizado com folhas de *ginseng* (*Panax ginseng*), evidenciou maior ação sequestradora de radical livre e atividade quelante de íons ferro em extrato etanólico. Além disso, este continha maior quantidade de compostos fenólicos e flavonóides que os extratos aquoso e metanólico em extração sequencial com água, etanol e metanol, respectivamente. Já estudos realizados por Mau et al. (2005a) demonstraram que a água extrai com eficiência os compostos fenólicos de cogumelos *Ganoderma tsugae* com atividade antioxidante, uma vez que o extrato metanólico apresentou maior atividade antioxidante, porém baixa concentração de compostos fenólicos (24,0 a 35,5 mg/g). No extrato aquoso, a concentração de fenólicos obtida foi de 40,86 a 42,34 mg/g (MAU et al., 2005b).

O tempo de extração também afeta consideravelmente a recuperação dos polifenóis. O período de extração deve variar entre 1 minuto a 24 horas. No entanto, longos períodos de extração aumentam a possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos (SHAIJI; NACZK, 1995). Em estudo realizado por Lapornik, Prosek e Wondra (2005), com resíduos de frutas vermelhas, os extratos foram preparados com etanol, metanol e água e em tempos de extração de 1, 12 e 24 horas. Comparando-se os resultados, o conteúdo de polifenóis diminuiu no extrato aquoso com maior tempo de extração, enquanto nos extratos metanólicos e etanólicos houve acréscimo no conteúdo de fenóis com o aumento do tempo.

No presente trabalho, o conteúdo de galocatequina foi mais abundante no EBHE (141 mg/100 g de matéria seca), seguido do EBAQ (88 mg/100 g de matéria seca) e do extrato derivado da ESC (3 mg/100 g de matéria seca).

Someya et al. (2002) quantificaram o conteúdo de galocatequina tanto na casca quanto na polpa de bananas provenientes das Filipinas, através da comparação com seu respectivo padrão externo. O conteúdo de galocatequina foi mais abundante na casca de banana (158 mg/100 g de matéria seca), em relação a polpa (29,6 mg/100 g de matéria seca), o

qual foi coerente com os seus resultados da análise de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante.

O conteúdo de galocatequina presente no EBHE ficou próximo dos achados de Someya et al. (2002) que também utilizaram a CLAE como metodologia analítica para detecção deste flavonóide. Segundo estes autores, a capacidade antioxidante dos extratos de casca de banana, proveniente da República das Filipinas, pode ser atribuída ao seu conteúdo de galocatequina (SOMEYA; YOSHIKI; OKUBO, 2002).

Entretanto, é importante ressaltar que apesar de ter sido verificado um menor teor de galocatequina no extrato derivado da ESC, outros produtos biologicamente ativos com baixa polaridade foram extraídos com este processo uma vez que o mesmo apresentou importante atividade antitumoral.

E, não obstante, cabe ainda considerar que o perfil cromatográfico (Figura 12) obtido a partir dos extratos de *Musa* spp. aplicados neste trabalho apontou, além do pico de retenção da galocatequina, outros compostos que possivelmente estão contribuindo de forma sinérgica para as atividades biológica dos extratos. Diferentemente dos achados de Someya, Yoshiki e Okubo (2002), nas cascas de banana *Musa* spp. cultivadas no município de Jacinto Machado/SC o constituinte majoritário desse material quando submetido aos métodos de extração convencionais e supercrítico não é o flavonóide galocatequina.

6.2. Atividade cicatrizante

No presente estudo, o processo de reparação tecidual de lesões cutâneas, experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos Balb/C, foi avaliado do ponto de vista da cinética de regressão da área da lesão ao longo do tempo, tanto a nível macroscópico – abordando parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um determinado composto - quanto microscópico, através do estudo histológico da lesão. Além disso, foram avaliados alguns marcadores bioquímicos, como a quantificação espectrofotométrica de hidroxiprolina, assim como indicadores de estresse oxidativo nas amostras de tecido cicatricial. Também é importante ressaltar que este estudo não utilizou nenhum fármaco para evitar a infecção das lesões uma vez que estes poderiam eventualmente interferir no processo de cicatrização. Entretanto, observaram-se técnicas antissépticas e assépticas na tentativa de manter o leito das lesões sem qualquer contaminação. Assim, os animais foram

mantidos em gaiolas isoladas, que foram lavadas diariamente e tiveram a maravalha substituída por folhas de papel toalha.

Diante disso, foram analisadas a nível macroscópico as variáveis que mediram o grau de reparação e que caracterizam o potencial cicatrizante de um composto. As lesões foram observadas diariamente no intuito de se determinar o período de epitelização (OLIVEIRA et al., 2000). Os resultados dispostos na Tabela 3 indicam que os animais do grupo controle negativo precisaram, em média, de 14 dias para que fosse finalizado por completo o processo de cicatrização espontânea. Enquanto isso, o tratamento com alantoína aplicado aos animais do grupo controle positivo fez com que o período médio necessário para completa cicatrização fosse de 11 dias.

A alantoína foi isolada e caracterizada quimicamente por Vanquelin e Buniva, em 1800, e posteriormente sintetizada por Grimax, em 1876 (SHESTOPALOV et al., 2006). Este composto é o produto final da metabolização da purina e está amplamente disseminada nos vegetais. É um produto de extração obtido a partir da raiz do confrei (*Symphytum officinale* Linn.) que vem sendo utilizado por suas propriedades cicatrizantes, mesmo antes de se ter comprovado experimentalmente suas propriedades queratolítica, hidratante e epitelizante, ou seja, promotora da proliferação celular e cicatrizante (PEREIRA, 2003). Atualmente, a alantoína utilizada na composição de produtos para cuidado da pele é de fonte sintética. Segundo relatos de vários pesquisadores este composto pode induzir a proliferação celular e, além disso, possui atividade antiinflamatória, antipéptica, antipsoríase, antiúlcera, imunoestimulante, queratolítica e analgésica, sendo amplamente utilizada em dermatologia (SHESTOPALOV et al., 2006; DRAELOS, 2001; MARTINDALE, 1993; JOANNE, 1988).

6.2.1. Período de epitelização

Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que os animais quando tratados com os extratos derivados de casca de *Musa* spp., tanto com EBAQ quanto com EBHE, apresentaram um menor período médio (9 dias) de epitelização que grupo controle positivo tratado com alantoína. Essa diferença foi significativa ($p < 0,001$) entre os dois grupos de tratamento EBAQ e EBHE tanto em relação ao grupo controle positivo quanto ao grupo controle negativo. Portanto, pode-se afirmar que os tratamentos com os extratos provenientes de casca de banana *Musa* spp. (EBAQ e EBHE na concentração de 50 mg/kg/dia, respectivamente) foram mais efetivos quanto ao parâmetro período de

epitelização. Todavia, os tratamentos com extrato apresentaram resultado semelhante, quando comparados entre si.

A dose escolhida para o tratamento das lesões, em um primeiro momento e durante a análise do período de epitelização, foi de 50 mg/kg/dia de extrato de casca de banana *Musa* spp. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios e, a partir disso, convencionou-se a dose de 50 mg/kg/dia para a análise dos demais parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um composto.

Existem vários relatos na literatura sobre o uso de plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas, entre eles podemos citar a *Morinda citrifolia* Linn (Rubiaceae). *M. citrifolia* é utilizada por curandeiros da Polinésia no tratamento de queimaduras e cicatrização de lesões. Estudos realizados por Nayak, Sandiford e Maxwell (2007) empregando o modelo de lesão por excisão em ratos, demonstrou uma diminuição do tempo de epitelização no grupo de animais tratados com o extrato das folhas de *M. citrifolia*. Da mesma forma, Pattanayak e Sunita (2007) estudaram o potencial cicatrizante promovido pelo extrato etanólico das partes aéreas de *Dendrophthoe falcata* (L.f) e observaram uma diminuição no período de cicatrização nos animais tratados com uma pomada contendo 10% de extrato da planta em relação ao grupo controle.

A fim de avaliar a atividade de cicatrizante de *Colutea cilicica*, Süntar et al. (2009) aplicaram extratos aquosos da floração e dos frutos dessa planta em um modelo de excisão tecidual em camundongos até completa cicatrização. Os animais tratados com o extrato dos frutos de *Colutea cilicica* apresentaram uma porcentagem de redução da lesão equivalente a 78,1 % aos 12 dias de tratamento, enquanto que os animais do grupo controle tratados com Madecassol (Bayer) apresentaram porcentagem de redução da lesão equivalente a 100 % no mesmo período. Uma análise preliminar dos extratos aquosos dos frutos e das partes aéreas de *Colutea cilicica* indicou elevado conteúdo de flavonóides e alguns taninos em sua composição. Segundo estes autores, os flavonóides também são conhecidos por promover a cicatrização de lesões, principalmente devido à sua propriedade antimicrobiana, e parece ser responsável pela contração da lesão e pela elevada taxa de epitelização (SÜNTAR et al., 2009).

Mensah et al. (2001) estudaram o extrato aquoso de folhas de *Buddleja globosa*, utilizada tradicionalmente na medicina chilena como um agente cicatrizante, quanto a sua capacidade de estimular o crescimento de fibroblastos em modelo experimental *in vitro*, além da sua atividade antioxidante no mesmo sistema de fibroblastos desafiados

com peróxido de hidrogênio. Baixas concentrações do extrato proporcionaram um aumento no crescimento de fibroblastos. O extrato apresentou efeito antioxidante forte e o seu fracionamento culminou no isolamento de três flavonóides e dois derivados do ácido caféico.

Svobodová, Walterová e Psotová (2006) investigaram o efeito protetor do extrato de *Silybum marianum*, contendo silimarina, silibina e dehidrosilibina, além de quercetina e taxifolina contra o dano induzido por peróxido de hidrogênio em queratinócitos e fibroblastos de camundongos. O pré-tratamento com os compostos testados diminuiu o dano oxidativo. Dehidrosilibina e quercetina foram os compostos protetores mais eficientes, corroborando o potencial antioxidante dos mesmos. De acordo com os autores, a administração de antioxidantes tem demonstrado ação importante no reparo e na resolução de processos cicatriciais do tecido cutâneo. Portanto, os autores sugerem que a silimarina, as flavonolignanas (silibina e dehidrosilibina) e os flavonóides (quercetina e taxifolina) podem ser agentes úteis no processo de regeneração tecidual.

Khalil, Afifi e Al-Hussaini (2007) avaliaram o potencial cicatrizante dos extratos aquosos de *Inula viscosa*, *Ajuga chia*, *Rubia taenifolia* e *Parietaria diffusa*, e do óleo essencial de *Laurus nobilis*. Os camundongos foram submetidos ao modelo de excisão dorsal e tratados com as diferentes preparações, em intervalos de 12 horas, quatro vezes em dois dias sucessivos de tratamento. Durante 16 dias, as feridas foram visualmente observadas, documentadas fotograficamente e a área da lesão foi medida. A melhor atividade cicatrizante foi observada nos extratos de *Inula viscosa*, seguido por *Parietaria diffusa*, *Laurus nobilis* e *Ajuga chia*, os quais apresentaram compostos fenólicos/flavonóides, entre outras substâncias, em sua composição conforme os resultados obtidos na análise fitoquímica. O extrato menos ativo foi o de *Rubia taenifolia*, cuja análise fitoquímica não identificou tais compostos.

6.2.2. Porcentagem de redução da lesão

A cicatrização é um processo complexo e dinâmico de restabelecimento das camadas de tecido epitelial e estruturas celulares, em uma área lesionada, o mais próximo possível ao seu estado normal. A contração da lesão é um processo que ocorre durante todo o processo de cura, tendo início na fase fibroblástica. Na fase de maturação, a fase final do processo de cicatrização, a lesão continua sofrendo contração, resultando em uma menor quantidade de tecido cicatricial aparente. O tecido de granulação formado na parte final da fase proliferativa é

primariamente composto por fibroblastos, colágeno, edema e os pequenos e novos vasos sanguíneos (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

No presente estudo foi determinada a porcentagem de redução da área lesionada a cada 3 dias do período cicatricial, o que denota a contração temporal da lesão em relação à área inicial tendo sido utilizado a técnica planimétrica digital. Os dados obtidos a partir da utilização desta técnica demonstraram que aplicações tópicas de extratos de casca de banana *Musa spp.*, tanto EBAQ quanto EBHE, estimularam significativamente a atividade cicatrizante.

Desde a antiguidade, os flavonóides têm sido utilizados como anestésico local, agente esterilizante e agente promotor da regeneração celular, sendo produzidos a partir do própolis ou do mel, com a finalidade de cobrir, proteger e curar lesões. Além disso, apresentam propriedades bactericida descrita por Harborne et al. (1986), Bagaev (1978) e antiviral descrita por Miller e Lenard (1981), Veckenstedt e Pusztai (1981), entre outros pesquisadores. Havsteen (2002) afirma que alguns flavonóides são requeridos para apoiar a regeneração dos tecidos após a lesão. No entanto, este processo é tão complexo que a atribuição específica de mecanismos para os efeitos de flavonóides só é possível para alguns dos seus aspectos.

A reconstrução do tecido danificado requer uma ação coordenada de um grande número de sistemas bioquímicos. As lesões são reparadas mais lentamente quando se apresentam infectadas. Isso justifica a importância de manter a esterilidade do leito da lesão, assim como fundamenta achados das práticas médicas na Idade Antiga referente ao uso de curativos contendo, por exemplo, mel ou pomada de própolis (HAVSTEEN, 2002).

Os parâmetros observados referentes ao potencial cicatrizante dos grupos de animais tratados com os extratos foram significativamente maiores em relação aos grupos controles, evidenciando o potencial cicatrizante dos extratos de casca de *Musa spp.* Este potencial cicatrizante dos extratos de casca de banana *Musa spp.* administrados por via tópica é ainda mais evidente quando comparado a alguns estudos apresentados na literatura, pois a resolução do processo cicatricial acontece em apenas 9 dias de tratamento. Assim, estudos realizados por Rashed, Afifi e Disi (2003) com extratos de *Portulaca oleracea* demonstraram uma capacidade de cicatrização de uma lesão por excisão de 14 dias. Estudos fitoquímicos com essa planta demonstraram que os flavonóides kaempferol, apigenina, miricetina, quercetina e luteolina, são os componentes biologicamente ativos, e têm sido relatados pelas

suas funções antioxidante, antibacteriana, antiviral, antiinflamatória e antiulcerativa (XU; YU; CHEN, 2006). Estes flavonóides apresentam estrutura química dos núcleos A, B e C semelhante à estrutura das catequinas, exceto pela presença de um grupo carbonila no anel C (Figura 5).

6.2.3. Conteúdo de hidroxiprolina

No presente trabalho, o tratamento das lesões com 50 mg/kg/dia de EBAQ promoveu um aumento progressivo do conteúdo de hidroxiprolina e estatisticamente significativo ao longo de todo o período experimental ($p < 0,001$), em relação ao grupo controle negativo. O mesmo ocorreu quando o grupo tratado com EBAQ foi comparado com o grupo controle positivo, que recebeu aplicação tópica do agente cicatrizante alantoína (50 mg/kg/dia). Haja vista os resultados obtidos a partir do tratamento das lesões com a aplicação tópica de EBAQ de casca de *Musa spp.*, pode-se inferir que o presente tratamento foi capaz de promover uma maior produção de colágeno durante o processo de cicatrização. Este resultado corrobora com os achados anteriormente comentados referente ao período de epitelização e porcentagem de redução da lesão, quando o grupo de animais tratados com EBAQ é comparado aos grupos controles. Portanto, foi observado que o tratamento com EBAQ proporcionou um menor período de epitelização da lesão, concomitantemente ao aumento da porcentagem de redução da lesão e ao conteúdo de hidroxiprolina nas amostras de tecido cicatricial que receberam aplicação deste extrato. Também foi observado um aumento significativo no conteúdo de hidroxiprolina nas amostras de tecido cicatricial nos animais que receberam aplicação tópica de 50 mg/kg/dia de EBHE, durante os 15 dias do período experimental.

A hidroxiprolina é um aminoácido essencial para a síntese das fibras de colágeno, as quais são produzidas, principalmente, em processos cicatriciais. Por essa razão, o conteúdo de hidroxiprolina é utilizado normalmente como um indicador para determinar o teor de colágeno (REDDY; ENWEMEKA, 1996). Uma concentração elevada de hidroxiprolina indica que o conteúdo de colágeno é abundante e que o reparo da lesão ocorreu de maneira mais rápida (NAYAK; UDUPA; UDUPA, 1999).

A análise bioquímica realizada mostrou aumento do conteúdo de hidroxiprolina, o qual é um reflexo do aumento da proliferação celular e, conseqüentemente, da síntese de colágeno, conforme já descrito por Nayak, Udupa e Udupa (1999). O colágeno não só confere força e

integridade da matriz tecidual, como também desempenha um papel importante na homeostase e na epitelização ao final da cicatrização (PATTANAYAK; SUNITA, 2008). Por isso, fica aqui implícita a importância da síntese aumentada de hidroxiprolina, a qual está intimamente relacionada à diminuição do período de epitelização e ao aumento da porcentagem de redução da lesão.

Ao término do período de tratamento e conclusão da cicatrização, observou-se que o conteúdo de hidroxiprolina aumentou significativamente em relação aos grupos controles, assim como ao nível basal, nos grupos de animais tratados tanto com EBAQ e EBHE. Isso indica que estes extratos, possivelmente através do sinergismo de compostos, anteriormente apresentados através do perfil cromatográfico, apresentam um potencial cicatrizante relevante. Entretanto, comparando os tratamentos com EBAQ e EBHE, foi observado um aumento significativamente maior no conteúdo de hidroxiprolina no tecido dos animais que receberam aplicação de EBAQ nos períodos de experimento de 6, 9 e 12 dias. Embora o conteúdo de galocatequina tenha sido em torno de 37 % menor no EBAQ, em relação ao EBHE, este se mostrou mais eficiente e com um possível potencial cicatrizante mais promissor.

Um agente que acelera os processos de cicatrização é um promotor da proliferação celular. A aplicação de extratos de plantas medicinais no tratamento de lesões de pele, em particular, queimaduras e ferimentos, tem longa tradição popular. Plantas com atividade cicatrizante têm sido experimentalmente estudadas em vários modelos animais no intuito de que sejam revelados compostos ativos promissores (ABUL-AL-BASAL, 2001)

A literatura científica traz várias estratégias para o tratamento de lesões. Um exemplo disso baseia-se no estudo desenvolvido por Shetty, Udupa e Udupa (2008), que demonstraram o potencial cicatrizante do extrato das folhas de *O. sanctum*. No modelo de lesão por excisão tecidual do tecido epitelial de ratos, Shetty, Udupa e Udupa (2008) mensuraram o conteúdo de hidroxiprolina em dias alternados. Este marcador bioquímico medidos em modelos experimentais para avaliação da atividade cicatrizante aumentou significativamente no tecido de granulação dos ratos tratados com extrato alcoólico das folhas de *O. sanctum* na dose de 400 mg/kg. O tecido de granulação formado na parte final do fase proliferativa foi composto, principalmente, de fibroblastos, colágeno e novos vasos sanguíneos. Segundo Shetty, Udupa e Udupa (2008), o aumento da massa de tecido de granulação nas lesões dos animais tratados com extrato sugere maior conteúdo de

colágeno e os constituintes presentes nos extratos das folhas de *O. sanctum* seriam responsáveis pela promoção da síntese de colágeno na fase proliferativa da cicatrização dessas lesões.

É importante ressaltar que o ESC mostrou elevada citotoxicidade quando aplicado no modelo de excisão em camundongo para avaliação do potencial cicatrizante e, por isso, foi descartada sua avaliação no estudo da atividade cicatricial dos extratos de casca de banana *Musa spp.*.

6.2.4. Estudo histológico da lesão

Além de investigar macroscopicamente e bioquimicamente o processo de cicatrização promovido pelo extrato de casca de *Musa spp.*, foi realizado o estudo histológico das lesões. O objetivo do estudo histológico foi confirmar, a nível histológico, o potencial cicatrizante do EBAQ, o qual mostrou-se mais efetivo quanto aos parâmetros bioquímicos e morfométricos da lesão quando comparado ao tratamento com EBHE.

Em uma primeira análise das lâminas histológicas, observou-se, após 3 dias do período cicatricial, a presença de uma crosta fibrino-leucocitária localizada na superfície da área lesada nas amostras de tecido dos grupos CN (controle negativo), CP (controle positivo) e EBAQL (animais submetidos ao modelo de excisão tecidual e tratados com extrato bruto aquoso de casca de banana) (Figura 22). A cicatrização de feridas é um processo fisiológico que se inicia com uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento de fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar e migração de leucócitos para a região lesada. A permeabilidade capilar promove extravasamento de plasma e seus componentes formando o exsudato inflamatório. Inicialmente, uma lesão é preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato formando uma crosta que a isola do meio ambiente quase que imediatamente (EURIDES et al., 1996).

Foi observado um espessamento da camada de queratina, essa que aumentou significativamente, no tecido dos animais do grupo EBAQL em relação ao tecido dos animais pertencentes aos grupos controles durante boa parte do período experimental. Observando a Tabela 8, nota-se que a epiderme sofreu um espessamento significativo no tecido dos animais do grupo EBAQL, principalmente aos 15 dias de tratamento, em relação aos grupos controles negativo e positivo. Provavelmente, isso se deve as propriedades cicatrizantes do extrato de casca de *Musa spp.* que podem estar relacionadas a estimulação de

proliferação celular e que neste trabalho foram claramente observadas nos cortes histológicos.

Ao estabelecer-se uma relação entre o grupo EBAQSL (Tabela 9) e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), notou-se que houve um espessamento significativo da camada de queratina na área de epitélio que recebeu aplicação do extrato (EBAQSL). Comparando o grupo EBAQSL e seu respectivo controle interno (CIEBAQ), notou-se que aconteceu uma diminuição significativa da espessura da epiderme do grupo EBAQSL ao longo de todo o período experimental. O espessamento da camada de queratina e uma diminuição na espessura da epiderme indicam que houve migração celular.

As células pós-mitóticas da camada superior da pele, a epiderme, sofrem uma série programada de diferenciação celular à medida que se movem lentamente da porção basal até a superfície dessa camada. Todas essas células são denominadas queratinócitos, produtores de queratina que é o principal tipo de filamento intermediário e corresponde a cerca de 85 % das proteínas dos queratinócitos. As células completamente queratinizadas conferem resistência e proteção e também colaboram para a impermeabilidade da pele. Além disso, na epiderme são encontrados os melanócitos (que conferem a pigmentação da pele) e as células sensoriais também denominadas células de Merkel (YOUNG et al., 2007; TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2008).

Durante o estudo histológico dos cortes de tecido epitelial cicatricial, a principal atividade observada foi a proliferação de fibroblastos. Os dados derivados do estudo histológico indicam que os tratamentos realizados com EBAQ, em relação aos grupos controles, induziram um processo de reepitelização controlado de maneira que a proliferação foi efetiva culminando na cicatrização das lesões. De maneira geral, o tecido de granulação apresentou-se claramente distribuído em duas regiões distintas, uma mais superficial (derme) e outra mais profunda (hipoderme) em todos os grupos experimentais. Na camada dérmica houve uma maior diferenciação, com maior número de fibras colágenas e fibroblastos, sendo que ambos tenderam a uma disposição paralela à superfície da ferida; na região hipodérmica, mais hialina, foi observada uma menor quantidade de fibras e fibroblastos.

A derme é a camada de tecido conjuntivo denso não-modelado, localizada logo abaixo da epiderme e é mais espessa que a epiderme. A derme é composta principalmente por colágeno, fibras elásticas e demais componentes de matriz, todos estes sintetizados por fibroblastos. Uma extensa rede de vasos sanguíneos na derme nutre a epiderme, essa última que não apresenta vasos sanguíneos em sua estrutura. A derme

também apresenta nervos e terminações nervosas, vasos linfáticos, pêlos e glândulas (YOUNG et al., 2007; TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2008).

A espessura da derme apresentou uma tendência de aumento durante o período cicatricial e, principalmente, aos 15 dias de tratamento nos grupos EBAQL, controle negativo e controle positivo (Tabelas 8, 4 e 5). Quando estabelecida a relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL com o tecido dos animais do grupo EBAQSL (Tabela 9), durante quase todo o período experimental foi observado o aumento significativo da espessura da derme. Relacionando o grupo EBAQSL e seu respectivo controle interno (CIEBAQ) (Tabela 6), observou-se que a espessura da derme nos animais do grupo EBAQSL aumentou ao longo de boa parte do período cicatricial, sendo este significativo aos 6 e aos 15 dias de tratamento. Mais uma vez ficou evidente o potencial cicatrizante do extrato de casca de *Musa spp.*, o qual proporcionou um aumento na atividade proliferativa de fibroblasto, o que reflete no aumento da deposição de colágeno na derme contribuindo com o aumento da espessura dessa camada, principalmente, em relação aos grupos controles negativo e positivo. Apesar de ter sido observado o aumento da espessura da camada epidérmica, bem como o aumento da concentração de hidoxiprolina no tecido dos animais do grupo EBAQL, quando aplicado o teste estatístico de Spearman, que estabelece uma correlação entre os parâmetros microscópicos de estudo, foi observada uma correlação positiva, porém não significativa.

A hipoderme, também conhecida como tecido subcutâneo é formada por tecido adiposo e contém a base (bulbo) dos folículos pilosos, glândulas e também contém os vasos maiores que suprem e drenam a vascularização sanguínea dérmica (YOUNG et al., 2007; TELSER; YOUNG; BALDWIN, 2008).

A espessura da hipoderme apresentou uma tendência de aumento, conforme observado na camada epidérmica, durante o período cicatricial nos grupos controle positivo, EBAQL e EBAQSL (Tabelas 5, 8 e 9). A espessura da hipoderme do grupo EBAQL aumentou significativamente a partir dos 6 dias de tratamento e até o fim do período experimental, em relação ao grupo controle negativo (Tabela 4). Comparando o tratamento do grupo EBAQL com o do grupo controle positivo, foi visto que ocorreu um aumento significativo na espessura da camada hipodérmica no grupo EBAQL aos 6 e aos 15 dias de tratamento. Estabelecida uma relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL com o tecido dos animais do grupo EBAQSL, foi

observado que durante todo o processo cicatricial aumentou significativamente a espessura da hipoderme.

Tratando-se dos anexos epidérmicos, observou-se que a quantidade de folículos pilosos do grupo EBAQL (Tabela 8) aumentou significativamente ao longo de todo o processo de cicatrização, quando comparada a quantidade destes anexos epidérmicos presente no tecido dos animais do grupo controle negativo (Tabela 4). Comparando o tratamento do grupo EBAQL com o do grupo controle positivo (Tabela 5), observou-se que ocorreu um aumento significativo no número de folículos pilosos no grupo EBAQL aos 3, 6, 9 e aos 15 dias de tratamento. Estabelecida a relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL com o tecido dos animais do grupo EBAQSL (Tabela 9), foi observado que o número de folículos pilosos aumentou significativamente durante os 6 e os 15 dias do processo cicatricial.

Nos cortes histológicos das lesões epiteliais de camundongos também foi avaliado o número de vasos sanguíneos (artérias e veias). No grupo EBAQL (Tabela 8), o número de vasos manteve-se relativamente elevado durante o período cicatricial, exceto aos 6 dias do mesmo em que foi observado um decréscimo neste número. De acordo com a Tabela 8, pode-se afirmar que a quantidade de artérias e/ou veias no tecido epitelial do grupo EBAQL aumentou ao longo de todo o período de cicatrização, quando comparada a quantidade dessas estruturas presente no tecido dos animais do grupo controle negativo. Comparando o tratamento do grupo EBAQL com o do grupo controle positivo (Tabela 5), observou-se que também ocorreu um aumento no número de vasos ao longo de todo o período no grupo EBAQL. Porém, somente aos 12 dias não foi observada diferença estatística significativa. Estabelecida a relação entre o tecido dos animais pertencentes ao grupo EBAQL com o tecido dos animais do grupo EBAQSL (Tabela 9), notou-se que o número vasos aumentou significativamente durante os 3, 9, 12 e os 15 dias do período cicatricial. Foi notável a ocorrência da angiogênese nos animais que receberam o tratamento com os extratos de casca de banana, assim como o aumento no conteúdo de hidroxiprolina. Portanto, esses são indícios de que muito provavelmente está associada à capacidade dos constituintes dos extratos de casca de *Musa spp.* a indução de mecanismos de proliferação celular.

Embora, didaticamente, o processo de reparo de lesões esteja dividido em três fases principais, na verdade elas não são estanques e sim interdependentes e sobrepostas dinamicamente no tempo. Para a evolução de cada uma das fases, ocorrem eventos celulares (como

migração e transmigração celular), tissulares (como vasoconstrição, vasodilatação, angiogênese e formação de tecido de granulação) e metabólicos (como coagulação e deposição de matriz extracelular).

O reparo tissular é um processo complexo, que envolve a interação entre células estromais e circulatórias que são ativadas por uma grande variedade de mediadores químicos, fragmentos de células e matriz extracelular, microorganismos e por alterações físico-químicas no microambiente da lesão e das áreas adjacentes. A produção de mediadores protéicos e lipídicos é crítica para o processo de cicatrização, uma vez que a migração celular, a indução mitótica de células lábeis locais e a produção de matriz extracelular são eventos centrais (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

O estudo histológico da lesão, derivada do modelo de excisão dorsal em camundongos tratados com extrato aquoso de frutos de *Colutea cilicica*, realizado por Süntar et al. (2009), revelou um processo de reepitelização da lesão bastante eficiente e comparável ao tratamento com o medicamento de referência Madecassol. Foi vista uma camada epidérmica fina e queratinizada. Também ficou evidente a presença de fibroblastos e folículos pilosos. É importante ressaltar que, como já foi comentado anteriormente, *C. cilicica* é rica em flavonóides. Estes compostos flavonóides têm usos terapêuticos devido às suas propriedades antiinflamatória, antioxidante, antifúngica e cicatrizante. Além disso, os flavonóides e os seus derivados são conhecidos por diminuir a peroxidação lipídica, por promover a vascularização e prevenir ou retardar o progresso da necrose celular. Assim, sugere-se que inibindo a peroxidação lipídica é possível aumentar a viabilidade das fibras de colágeno e sua força além de promover a síntese de DNA e conseqüentemente a proliferação celulares (SHETTY; UDUPA; UDUPA, 2008).

6.2.5. Marcadores de estresse oxidativo

No presente estudo, os resultados referentes à análise dos níveis de peroxidação lipídica (Figura 15), através da quantificação espectrofotométrica do malondialdeído (MDA), mostraram que os tecidos cicatriciais dos camundongos que receberam aplicação tópica de EBAQ exibiram uma considerável diminuição da lipoperoxidação durante todo o período cicatricial, quando comparados aos do grupo controle negativo, mantendo o nível de dano tecidual abaixo do que foi observado em tecido cutâneo normal, conforme indicado pelo dia 0 (zero), este considerado como nível basal. Assim como os animais

tratados com EBAQ, aqueles que receberam aplicação tópica de EBHE apresentaram uma diminuição significativa no nível de peroxidação lipídica durante boa parte do período de tratamento (com exceção do período de 9 dias de tratamento), em relação ao grupo controle negativo. Em relação ao grupo controle positivo, os animais tratados com EBAQ apresentaram nível de lipoperoxidação menor e estatisticamente significativo para todos os intervalos de tempo do período experimental. Os resultados obtidos a partir do tratamento das lesões com EBHE provocaram um aumento significativo no período de 9 dias de tratamento. Em contrapartida, o tratamento com EBHE mostrou-se estatisticamente significativo ao diminuir a concentração de lipoperóxidos ao final do experimento, isto é, aos 15 dias de tratamento. Entre os grupos tratados com EBAQ e EBHE observou-se diferença estatística significativa quanto ao dano tecidual ao longo de todo o período experimental. Da mesma forma, foi observado um dano tecidual menor que o normal, principalmente, nas amostras de tecido cicatricial dos animais do grupo EBAQ. Ao final de 15 dias de tratamento e conclusão do processo de cicatrização, observou-se que o nível de peroxidação lipídica diminuiu significativamente em relação aos controles positivo e negativo, nos animais tratados tanto com EBAQ quanto com EBHE. Além disso, os tratamentos com extrato de *Musa spp.* fizeram com que os níveis de lipoperóxido fossem mantidos abaixo do nível basal quando concluída a cicatrização.

Perez-Perez et al. (2006) estudaram as propriedades antioxidantes de bananas e plátanos e observaram que os extratos aquosos de ambos foram capazes de diminuir a concentração de malondialdeído e hidroperóxidos lipídicos gerados no leito da lesão de ratos Wistar albino. Em geral, a banana maçã (fruta) produziu o extrato com maior potencial de inibição da peroxidação lipídica. Também foi possível constatar que ocorreu uma maior inibição em relação à produção de malondialdeído do que a produção hidroperóxidos lipídicos, e que a melatonina e vitamina E têm uma capacidade antioxidante comparável à que a encontrada nos extratos de banana.

Considerando, ainda, a existência de um papel definido dos radicais livres na patogênese da lesão, Singh et al. (2006) estudaram o potencial cicatrizante e antioxidante de *Plagiochasma appendiculatum* (PAE). Os resultados indicaram que PAE possui atividade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica, validando sua atividade cicatrizante através do potencial *scavenging* de radicais livres.

Panchatcharam et al. (2006) realizaram um estudo sobre o estado de peroxidação lipídica em lesões tratadas com curcumina, e observaram

que este composto por possuir atividade antioxidante significativa, ajudou a prevenir o dano oxidativo e promoveu o processo de cicatrização, além de atuar como um potente inibidor de dano em queratinócitos e fibroblastos. A atividade antioxidante da curcumina foi atribuída aos grupos fenólico e os metóxi em conjunto com o sistema dieno conjugado a 1,3 dicetona, na detoxificação de EROs.

Parihar et al. (2008) em ensaios clínicos com pacientes queimados demonstrou um decréscimo nos níveis de selênio, ácido ascórbico, beta-caroteno e licopeno, concomitante ao aumento dos produtos de peroxidação lipídica. Após tratamento com antioxidantes convencionais, como a vitamina C, foi demonstrada a restauração dos níveis de defesas antioxidantes, o que atenuou a lesão tecidual (PARIHAR et al., 2008).

Finalmente, os resultados obtidos com o presente trabalho sugerem que os extratos de casca de banana *Musa spp.* ora testados foram capazes de impedir o dano oxidativo às estruturas celulares no leito da lesão, durante todo o período experimental, o que foi de suma importância nos primeiros dias do processo cicatricial, pois permitiu um controle dos níveis de EROs. Nos dias subsequentes, condicionou o espaço lesionado à proliferação celular necessária, culminando com a conclusão deste processo de forma rápida e eficaz.

O principal regulador intracelular da homeostase das reações de oxirredução é a GSH, que age por oxidação reversível de um grupo tiol ativo. A GSH é um dos principais constituintes dos mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, a qual atua diretamente ou via glutathione peroxidase nas reações *scavenger* de EROs. O conteúdo intracelular de GSH e glutathione oxidada (GSSG) normalmente é mantido elevado, através da redução da GSSG à GSH pela enzima glutathione redutase. Isso permite que haja uma quantidade considerável de GSH para atuar como uma substância antioxidante no organismo. Segundo Parihar et al. (2008) na isquemia tecidual após uma lesão por queimadura esgota-se os níveis intracelulares de GSH e, provavelmente, isso está relacionado ao consumo de GSH em excesso durante o estado de estresse oxidativo.

Analisando o período de cicatrização como um todo, foi observado no presente trabalho uma tendência de normalização nos níveis de GSH, em relação ao nível basal determinado no dia 0 (zero), conforme a Figura 17, tanto no grupo de animais tratados com EBAQ quanto no grupo EBHE. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os valores basais de GSH e os níveis alcançados ao final da cicatrização após tratamento com os respectivos extratos de

Musa spp.. Por isso, pode-se afirmar que os tratamentos com os extratos de casca de banana Musa spp. restabeleceram os níveis da GSH no tecido cicatricial dos animais findo o processo de cicatrização.

Cabe, ainda, ressaltar que o tratamento com EBHE, quando comparado ao EBAQ, foi capaz de aumentar significativamente o conteúdo de GSH durante todo o período cicatricial. O conteúdo deste tiol nas amostras de tecido cicatricial provenientes dos animais tratados com EBAQ e com EBHE apresentou-se mais elevado e estatisticamente significativo durante todo o período experimental, quando comparado aos grupos controle positivo e negativo. Tendo em vista os resultados obtidos a partir do tratamento das lesões com os EBAQ e EBHE, pode-se inferir que o tecido cicatricial recuperou os níveis de GSH ao final da cicatrização da lesão. Isso deve-se, provavelmente, ao restabelecimento da homeostase redox no leito da lesão que, possivelmente, foi atingido devido à ação dos compostos antioxidante presentes nos extratos de casca de Musa spp.

Outro marcador importante para caracterização de estresse oxidativo *in vivo* é a detecção da oxidação protéica. A presença de níveis elevados de proteínas oxidadas no leito da lesão em relação à pele normal, caracterizadas pela presença de grupos carbonila, indica um estado de estresse oxidativo importante. Além disto, o nível elevado de proteínas oxidadas correlaciona-se diretamente com processos inflamatórios e com a diminuição da taxa de cicatrização da lesão (KUMIN et al., 2007).

Seguindo a resposta constatada nos níveis de lipoperoxidação, ocorreu uma forte diminuição no nível de carbonilação protéica, principalmente, nas amostras de tecido cicatricial dos grupos EBAQ e EBHE até a total conclusão do processo de cicatrização ao final de 15 dias de tratamento dos animais.

Podemos supor que a aplicação tópica dos extratos de casca de banana Musa spp., os quais contêm quantidade considerável de galocatequina, entre outros compostos em quantidade relevante, permitiu diminuir o estresse oxidativo. Isso ocorreu, especialmente, através da diminuição dos danos teciduais e moleculares, provavelmente em consequência a ação sinérgica de todos estes compostos presentes nos extratos de casca de Musa spp.. Possivelmente, esta ação sinérgica está diretamente relacionada ao poder antioxidante dos extratos, conforme relatado na literatura (SOMEYA; YOSHIKI; OKUBO, 2002; DAVEY, 2006; VIJAYAKUMAR; PRESANNAKUMAR; VIJAYALAKSHMI, 2008).

Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não seja um radical livre, este pode causar dano celular grave devido à geração de radical hidroxil na presença de íons ferro ou cobre (reação de Fenton). Radicais hidroxila são altamente agressivos, resultando na oxidação de macromoléculas celulares. Portanto, o H_2O_2 deve ser rapidamente detoxificado pela ação da CAT que o transforma em água e oxigênio (SCHÄFER; WERNER, 2008).

A atividade da CAT esteve aumentada no tecido cicatricial dos animais pertencentes aos grupos controles positivo e negativo, bem como no grupo tratado com EBHE, principalmente, nos primeiros dias do processo de cicatrização da lesão (Figura 18). Isso reflete a demanda considerável de EROs geradas no leito da lesão devido à primeira fase do processo de reparação tissular. E, além disso, o aumento na atividade enzimática da CAT permaneceu até o final dos 15 dias do período experimental no grupo controle negativo. Possivelmente, tal fato indica geração de EROs no leito da lesão e pode ser decorrente da resposta inflamatória e de mecanismos de sinalização celular no intuito de evitar uma infecção e promover proliferação celular. Foi observado ainda que, no início da cicatrização (entre 3 e 6 dias do período de tratamento), o tecido cicatricial dos animais provenientes do grupo tratado com EBAQ apresentou uma diminuição estatisticamente significativa da atividade enzimática da CAT, quando comparada as atividades dos grupos controles positivo, bem como em relação ao grupo EBHE. Dando continuidade ao processo cicatricial, observou-se que houve diferença estatística significativa aos 12 e aos 15 dias de tratamento com EBAQ, em relação ao controle negativo. E quando comparado com o grupo controle positivo, o tratamento com EBAQ mostrou-se significativo somente ao final dos 15 dias do processo cicatricial. Quando comparado ao controle positivo, o tratamento com EBHE promoveu a diminuição da atividade da enzima CAT nos primeiros dias do processo cicatricial, porém houve diferença estatística significativa apenas aos 6 dias deste tratamento.

Na literatura há relatos de que ocorre um decréscimo na atividade da enzima CAT proveniente do tecido cicatricial de ratos, possivelmente porque está acontecendo inativação enzimática mediada pelo excesso de EROs ou devido a ação de substâncias antioxidantes que são capazes de neutralizar estes radicais (SCHÄFER; WERNER, 2008). Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível supor que provavelmente está ocorrendo uma modulação do estresse oxidativo gerado no tecido cicatricial, uma vez que foram analisados vários marcadores bioquímicos relacionados, os quais apresentaram-se

alterados, principalmente nos primeiros dias após a lesão, e tenderam aos níveis basais de um tecido íntegro.

Devido ao curto tempo de meia-vida das EROs, suas concentrações *in vivo* são difíceis de determinar. No entanto, os níveis de H_2O_2 foram recentemente determinados no líquido da lesão aguda decorrente do modelo murino excisional (ROY et al., 2006). Este estudo de Roy et al. (2006) revelou que baixas concentrações de H_2O_2 (100-250 μM) estão presentes no leito da lesão. Níveis mais altos foram encontrados durante a fase inflamatória (2 dias após a lesão), em comparação com a fase posterior, quando ocorre a formação de tecido novo (5 dias depois lesão). Além do H_2O_2 , a presença do ânion superóxido nas bordas da lesão foi detectado através da coloração de cortes histológicos congelados com o corante dihidroetídeo. Estes estudos revelaram que o pico dos níveis de ânion superóxido é atingido em cerca de dois dias após a lesão de excisão tecidual e em toda a sua extensão.

O ânion superóxido é gerado por várias oxidases, em especial, pela NADPH oxidase, e pode ser dismutado a H_2O_2 e água por três tipos de SODs: a citosólica, a mitocondrial e a extracelular. A partir de amostras de tecido cicatricial, derivadas de modelo excisional de lesão, foi determinada uma regulação positiva da SOD citosólica e da SOD mitocondrial, com níveis de expressão observados no início da fase inflamatória (SCHÄFER; WERNER, 2008). O tratamento antioxidante, por exemplo, utilizando a curcumina, resultou em aumento dos níveis de SOD e também de CAT e GPx no local da lesão. Em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina tipo I, um protocolo de terapia gênica cutânea para SOD mitocondrial reduziu os níveis de ânion superóxido no leito da lesão e diminuiu o período de cicatrização em relação ao grupo controle. Estes estudos sugerem que a ação de detoxificação da enzima SOD é benéfica para o tecido cicatricial (SCHÄFER; WERNER, 2008). Singh et al. (2006) estudaram o potencial antioxidante de *Plagioclasma appendiculatum* e identificaram um aumento na atividade da SOD durante o tratamento de lesões, o que segundo os autores valida o potencial antioxidante de um determinado extrato.

A produção do ânion superóxido ficou comprometida em camundongos que não apresentavam Rac2, uma das subunidades essenciais da enzima NADPH oxidase, a qual está correlacionada com uma cicatrização prejudicada nestes animais. Estes resultados sugerem que baixos níveis de EROs produzidos em lesões são importante para o processo de reparação. Na maioria dos estudos, os níveis de EROs no

local da lesão são determinados indiretamente através da análise de marcadores de estresse oxidativo (SCHÄFER; WERNER, 2008).

De acordo com a Figura 19, a enzima SOD apresentou atividade elevada nos estágios iniciais da cicatrização, porém de maneira geral mostrou tendência de normalização em nível basal em todos os grupos experimentais. Isso pode ser um reflexo de uma necessidade inicial das defesas antioxidantes manterem-se elevadas, para tentar combater a agressão causada no tecido cutâneo pelo peróxido de hidrogênio. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo com uso de extrato de casca de banana estão de acordo com achados da literatura científica descrita por Schäfer e Werner (2008). E de acordo com Valko et al. (2007), o aumento da atividade da SOD provoca uma diminuição na concentração de ânion superóxido nas células, o que reduz a estimulação da proliferação celular através dos mecanismos de sinalização mediados por EROs. O tratamento com EBAQ não apresentou diferença estatística significativa em relação ao nível basal e, por isso, pode-se especular que este tratamento conseguiu restabelecer a atividade enzimática da SOD. Em contrapartida, o tratamento com EBHE não conseguiu fazer com que a atividade da enzima no tecido cicatricial diminuísse após os 15 dias de tratamento até atingir o seu nível basal. Nos tecidos cicatriciais dos animais tratados com EBHE e, principalmente, com EBAQ houve diferença significativa na atividade enzimática da SOD, essa que esteve diminuída em relação aos grupos controles. Isso pode ter acontecido possivelmente em função da presença de antioxidantes exógenos aplicados no leito da lesão que, consequentemente, pouparam o tecido cicatricial tratado com os extratos de casca de *Musa spp.* em relação a atividade enzimática da SOD observada nos grupos controles. Também foi observada diferença significativa entre os grupos EBAQ e EBHE. A atividade enzimática esteve diminuída e estatisticamente diferente no grupo EBAQ.

O efeito do extrato bruto de banana e de plátano na geração de radicais livres, neste caso, ânion superóxido e radical hidroxila, foi estudado por Perez-Perez et al. (2006) que observaram uma diminuição na produção destes radicais. Em geral, a banana Maçã apresentou porcentagens mais elevadas de inibição para a formação destes dois outros radicais, seguido de banana Cavendish e do plátano. Quando foram comparados com extratos de melatonina e vitamina E, pode-se observar que, no caso de ânion superóxido, a banana maçã teve capacidade antioxidante semelhante ao da melatonina e da vitamina E, e os outros extratos apresentaram uma capacidade inferior. No caso do radical hidroxila, a banana Maçã e a Cavendish demonstraram uma

capacidade antioxidante superior a melatonina e vitamina E, por outro lado, o plátano teve uma capacidade antioxidante comparável a estes compostos puros.

Como é sabido, os antioxidantes de baixo peso molecular estão envolvidos diretamente na conversão de EROs a espécies menos reativas. A diminuição das concentrações de EROs devido ao excesso de antioxidantes pode estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos e, portanto, promover a reepitelização culminando na conclusão do processo cicatricial (VALKO et al., 2006). EROs e ERNs são produtos do metabolismo celular normal e são conhecidos por agir como mensageiros secundários no controle de várias funções fisiológicas normais do organismo e, portanto, a produção de $^{\bullet}\text{NO}$ pela óxido nítrico sintase e ânio superóxido pela NAD(P)H oxidase é rigidamente regulada por hormônios, citocinas e outros mecanismos. Além disso, EROs e ERNs participam em vários mecanismos envolvendo regulação redox das células no intuito de protegê-las contra o estresse oxidativo e manter a homeostase entre as reações de oxirredução. A superprodução de EROs decorrente da estimulação excessiva da NAD(P)H oxidase por citocinas resulta em estresse oxidativo. As EROs parecem ser fatores de regulação chave do desenvolvimento e disseminação de tumores a nível molecular, podendo ser consideradas muito importantes na terapêutica dessa patologia. Em contrapartida, o processo de cicatrização é justamente o oposto do que se busca na terapêutica contra o câncer. De um lado temos inibição da proliferação celular e de outro o objetivo é restabelecer a homeostase tecidual através do crescimento celular ordenado.

A enzima GPx possui ação muito semelhante à CAT, no sentido de neutralizar o H_2O_2 , e outros hidroperóxidos, com oxidação da GSH para formar a GSSG. Portanto, GPx converte o H_2O_2 , ou outros hidroperóxidos, até água, com oxidação da GSH formando a GSSG (Chance et al, 1979). Além disso, ela pode estar associada às membranas em que atua contra os hidroperóxidos originados pela lipoperoxidação. A GPx também tem um papel importante na proteção contra a citotoxicidade do óxido nítrico (GATÉ et al., 1999).

Durante todo o período de tratamento, o tecido cicatricial do grupo controle negativo apresentou atividade bastante elevada da GPx (Figura 20). Quando comparados os grupos EBAQ e EBHE ao controle negativo, pode-se observar diferença significativa quanto à diminuição da atividade enzimática no tecido cicatricial dos animais tratados com os respectivos extratos. Enquanto isso, o tecido cicatricial dos animais tratados tanto com EBAQ quanto com EBHE apresentou atividade

enzimática semelhante entre si, pois não houve diferença estatística. Quanto a relação entre o grupo controle positivo e os grupos EBAQ e EBHE, observou-se que o tratamento com os dois extratos foi capaz de manter a atividade enzimática da GPx próximo aos valores basais dessa, com diferença estatística significativa. Em relação a atividade enzimática basal da GPx determinado no dia 0 (zero), o tratamento com EBAQ fez com que essa enzima mantivesse sua atividade aqui considerada normal a partir dos 9 dias até o final do período cicatricial, pois não foi observada diferença estatística significativa. SOD e GPx são enzimas que protegem os tecidos contra os efeitos dos radicais livres e lipoperóxidos. A atividade de ambas as enzimas aumenta após a lesão mediada por radicais livres e a peroxidação lipídica (PARIHAR et al., 2008).

As GSTs são uma família de enzimas que utilizam GSH em reações que contribuem para a transformação de uma grande variedade de compostos, incluindo os carcinogênicos, medicamentos e produtos do estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). As GSTs demonstram uma capacidade peroxidase contra os hidroperóxidos orgânicos e também estão associadas à biotransformação de herbicidas, inseticidas e xenobióticos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da GSH a estes compostos, aumentando a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A atividade da enzima GST (Figura 21) no tecido cicatricial dos animais do grupo controle negativo mostrou-se alterada e estatisticamente diferente em relação ao grupo tratado com EBAQ durante quase todo o processo cicatricial, exceto aos 12 dias de tratamento. Enquanto isso, o tratamento com EBHE foi eficaz e significativo, em relação ao grupo controle negativo, aos 3, 6 e aos 15 dias do processo cicatricial. Em relação ao controle positivo, foi observada uma diminuição significativa da atividade enzimática no início e ao fim do processo cicatricial. E ao final do período de tratamento, o tecido cicatricial dos animais provenientes do grupo EBHE tendeu aos níveis enzimáticos basais, conforme o EBAQ. Além disso, o grupo tratado com EBHE mostrou diferença significativa na atividade enzimática, essa que esteve diminuída quando comparada ao grupo controles negativo. Outra diferença estatística significativa importante ocorreu quando estabelecida uma relação entre o controle positivo e o tratamento com EBHE. Neste último, a atividade da GST esteve significativamente aumentada, em relação ao controle positivo, até os 12 dias do processo de cicatrização.

A concentração da GSH é um importante fator associado à atividade da GST (KUMARAGURUPARAN et al., 2002; OUAISSI; OUAISSI; SERENO., 2002) e, dessa forma, os níveis de GSH também influenciam a expressão da GST. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a tendência de aumento da atividade da GST encontrada em todos os grupos experimentais, já que esta tendência também foi observada na GSH, principalmente nos grupos tratados com EBAQ e EBHE. Como a GST está também envolvida na eliminação de hidropéroxidos produzidos pelo processo de lipoperoxidação (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999), a diminuição acentuada dos níveis de lipopéroxidos, assim como nos níveis de carbonilação protéica, nos grupos experimentais que receberam aplicação de extratos da casca de *Musa spp.* possivelmente está relacionada com a diminuição de sua atividade com este tratamento.

Uma série de estudos recentes têm destacado o importante papel das EROs no processo de cicatrização de lesões. Por um lado, as EROs são necessárias para a defesa eficaz contra patógenos invasores. Mesmo em caso de ausência de infecção, os baixos níveis de EROs são necessários para que a sinalização celular aconteça, em especial a angiogênese. No entanto, a produção excessiva de EROs ou a total detoxificação dessas moléculas um tanto agressivas provoca o estresse oxidativo, e isto tem sido identificado como uma característica importante na patogênese das doenças crônicas e em lesões que não se consegue atingir a cura. Portanto, uma regulamentação mais estreita da produção e da detoxificação de EROs é crucial para o processo de reparação normal de uma lesão. A identificação de proteínas envolvidas nestes processos e a análise de sua funcionalidade *in vivo* já apontaram alguns reguladores chave do equilíbrio redox na cicatrização. No entanto, as funções de proteínas adicionais precisam ser exploradas e a interação da célula com a produção de EROs e as enzimas de detoxificação terá de ser caracterizada em breve. Provavelmente, este conhecimento resultará na identificação de novos alvos para o tratamento da cicatrização de lesões (SCHÄFER; WERNER, 2008).

A capacidade antioxidante observada por todos os métodos analisados neste trabalho foi semelhante ao encontrado por Sun et al. (2002), Pellegrini et al. (2003) e Perez-Perez et al. (2006) e pode ser atribuída à concentração de grupos fenólicos de compostos encontrados nos extratos de banana ou sua casca em comparação com outros compostos fenólicos. Em todos os casos houve uma correlação linear entre a atividade antioxidante e teor de fenóis dos extratos em estudo. No presente trabalho, o EBHE demonstrou atividade cicatrizante e

antioxidante relevantes em relação aos EBAQ e derivado de ESC. Alguns autores também relataram que as bananas contêm vários outros antioxidantes, como vitamina C, vitamina E, β -caroteno, dopamina, flavonóides (em particular, catequinas) e alcalóides. Por isso, a banana pode ser considerada uma fonte de antioxidantes naturais (PEREZ-PEREZ et al., 2006; AURORE; PARFAIT; FAHRASMANE, 2008).

6.3. Atividade antitumoral

Segundo vários autores, pelo menos um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. No caso dos fármacos antitumorais e dos antibióticos, por exemplo, este percentual atinge cerca de 70% (CALIXTO, 2003). Vincristina, irinoteca, etoposídeo e paclitaxel são exemplos de compostos derivados de plantas que estão sendo empregadas no tratamento do câncer. Uma análise recente do mercado de medicamentos antitumorais na América do Norte, Europa e Japão, durante o período de 1981 a 2006, revelou que 47,1% de um total de 155 agentes terapêuticos contra o câncer e aprovados clinicamente derivam de produtos naturais não modificados, de seus derivados semi-sintéticos ou de moléculas sintéticas baseadas no composto natural (NEWMAN; CRAGG, 2007).

A introdução de agentes terapêuticos derivados de produtos naturais com potencial antitumoral modificou o prognóstico de muitos tipos de câncer humano. Estes agentes estão oferecendo uma grande oportunidade para avaliar não somente novas classes de produtos químicos com atividade antitumoral, mas também novos e potencialmente relevantes mecanismos de ação (ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001).

6.3.1. Atividade citotóxica *in vitro*

A utilidade de um determinado composto como possível agente antitumoral é investigada, primeiramente, através de ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Assim, o principal objetivo é avaliar a capacidade deste composto quanto a inibição do crescimento e/ou indução da morte das células tumorais através de ensaios laboratoriais *in vitro*.

A etapa *in vitro* do estudo de citotoxicidade empregada no presente trabalho foi a partir da realização de testes do sal de tetrazólio (MTT). O ensaio do MTT avalia a função celular em nível mitocondrial, pois após

a sua absorção, o MTT é reduzido no interior das mitocôndrias das células viáveis a um produto chamado formazan, numa reação colorimétrica que possibilita avaliar a citotoxicidade (MOSMAN, 1983).

Os resultados obtidos indicaram que o extrato bruto aquoso (EBAQ) de casca de *Musa spp.* exibiu atividade citotóxica. Neste experimento, a incubação das células de TAE retiradas do camundongo após 9 dias da sua inoculação no animal, com concentrações crescentes de EBAQ, por 24 horas, reduziu significativamente a viabilidade celular em até 80,8 % (49,5; 70,7 e 80,8 %, para 125, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente); enquanto que concentrações crescentes de EBHE e ESC, por 24, 48 e 72 horas não foram capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular, quando comparados ao controle negativo (Figura 27). Dessa forma, EBAQ apresentou uma CI 50 de 152,83 µg/mL para células do TAE. Segundo Suffines e Pezzuto (1990), somente os extratos com valor de CI 50 < 200 µg/mL podem ser considerados ativos. Considerando o que foi preconizado por Suffines e Pezzuto (1990), somente o EBAQ foi considerado ativo.

A inibição verificada *in vitro* da atividade mitocondrial pode estar relacionada à presença de alguns compostos citotóxicos no extrato da casca de banana e sua atividade sinérgica. Seeram, Zhang e Nair (2003) determinaram efeitos inibitórios *in vitro* da galocatequina, presente na casca de banana, contra a proliferação de células tumorais humanas. Ogasawara, Matsunaga e Susuki (2007) descrevem a inibição provocada por vitaminas e polifenóis de casca de banana em relação à atividade invasiva *in vitro* e ao crescimento e as metástases em linhagens de células tumorais. Haja vista o conhecimento científico relacionado às propriedades antitumorais e citotóxicas e, dando continuidade aos ensaios de avaliação, os efeitos do EBAQ e ESC também foram avaliados *in vivo*.

6.3.2. Atividade antitumoral *in vivo*

Utilizou-se o carcinoma ascítico de Ehrlich, inoculado intraperitonealmente em camundongos isogênicos Balb/C. Nos camundongos inoculados, o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) causou um rápido desenvolvimento de ascite tumoral. Esta ascite causou no animal portador um aumento exagerado de peso e da circunferência abdominal. O líquido ascítico é a fonte nutricional direta para as células do tumor e a observação de um aumento rápido do seu conteúdo é acompanhado do crescimento do tumor (volume de células), o qual pode ser usado como

uma ferramenta para avaliar a requisição nutricional das células tumorais (PRASAD; GIRI, 1994).

No experimento em que os animais foram tratados com EBAQ e ESC na concentração de 150 mg/kg, a administração dos mesmos reduziu a circunferência abdominal e o peso corporal dos animais, resultados estes que estão diretamente relacionados a diminuição do volume de líquido ascítico observada com os respectivos tratamentos (Tabelas 11 e 12). E de acordo com os dados obtidos (Figura 28) ocorreu uma importante inibição do crescimento do TAE, onde o tratamento com EBAQ foi mais efetivo em inibir a expansão tumoral (57 %) que o ESC (49 %).

Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral (Tabelas 11 e 12) demonstram que o EBAQ e o ESC apresentaram significativa atividade quando comparado ao grupo controle negativo, uma vez que foram capazes de diminuir em torno de 56 e 26% o volume de líquido ascítico, respectivamente. Além disso, tanto o EBAQ quanto o ESC foram capazes de aumentar significativamente a proporção do número de células inviáveis em relação às células tumorais viáveis, assim como a sobrevida média dos animais tratados portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Um dos critérios mais aceitos pela comunidade científica para avaliar o potencial de um possível agente antitumoral é o aumento no tempo de sobrevida dos animais (CLARKSON; BURCHENAL, 1965). No presente estudo também foi observado um aumento relevante na porcentagem média de sobrevida, que correspondeu a 18,5 % nos animais tratados com EBAQ e 22,2 % nos tratados com ESC. Portanto, é provável que os extratos de casca de *Musa spp.* ao diminuírem o volume de líquido ascítico nutricional, o número de células viáveis e combaterem o tumor, tenham aumentado o tempo médio de sobrevida dos animais portadores ora tratados.

Comparando os grupos testes (EBAQ e ESC), observou-se que não houve diferença significativa em relação aos parâmetros histocitológicos. Entretanto, os animais do grupo teste tratados com EBAQ apresentaram maior proporção do número de células inviáveis em relação às células tumorais viáveis quando comparados com os animais do grupo ESC. A sobrevida média dos animais tratados com ESC, bem como a porcentagem média de sobrevida foram relativamente maiores em relação aos animais do grupo EBAQ, mas não houve diferença estatística significativa (Tabelas 11 e 12).

A pele é exposta diretamente à radiação UV na presença de oxigênio. Os radicais livres são produzidos pela radiação ultravioleta e

regulam o nível de mRNA para tirosinase, a enzima limitante da biossíntese de melanina. Embora o pigmento melanina na pele humana seja um mecanismo de defesa importante contra os raios ultravioleta da luz solar, a produção de pigmentação anormal, tais como melasma, sardas, lentigo senil e outras formas de hiperpigmentação de melanina podem se tornar um grave problema de saúde. Modular a síntese de melanina com o objetivo de prevenir essas alterações de pigmentação é extremamente importante. Epidemiologicamente, sabe-se que o consumo de chá verde (*Camellia sinensis*) pode ajudar a prevenir o câncer nos seres humanos (NO et al., 1999). De acordo com No et al. (1999), o chá verde mostrou atividade inibitória da enzima tirosinase de cogumelo. Os principais componentes bioativos do chá verde são (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-galocatequina-3-galato (GCG), e (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG). Todos estes compostos são catequinas que apresentam no seu sítio ativo um grupo ácido gálico, o qual é capaz de interagir com GCG através de um resíduo de L-tirosina.

A inibição da carcinogênese pelos compostos polifenólicos do chá verde tem sido demonstrada em diferentes modelos *in vitro* e também *in vivo*. Há uma semelhança entre as estruturas químicas dos compostos encontradas na composição de *C. sinensis* e a galocatequina presente nas cascas de banana *Musa spp.*, uma vez que são observadas estruturas polifenólicas características nestes flavonóides e a presença de grupos hidroxila nas extremidades livres destes.

Foi proposto pelos pesquisadores Hou et al. (2004) um mecanismo de auto-oxidação de EGCG e geração de espécies reativas, principalmente o peróxido de hidrogênio, que pode contribuir para a ativação da apoptose, além de inativar o receptor para o fator de crescimento epidermal e a enzima telomerase. Os resultados obtidos por Chung et al. (2003) sugerem que bloqueando a sinalização via esse receptor com EGCG pode-se inibir potencialmente a proliferação de células cancerígenas e a angiogênese, considerando a auto-oxidação de EGCG. V

Vários mecanismos estão envolvidos na prevenção do câncer. A inibição de proteínas quinase, por exemplo, é um mecanismo bioquímico de alteração em vias de sinalização celular proposto a partir do tratamento de células tumorais com EGCG.

Além disso, estudos têm demonstrado que EGCG pode induzir a parada do ciclo celular entre G_0/G_1 em linhagens de células tumorais. Liang et al. (1999) relataram que o tratamento de células MCF-7 com $30\mu\text{M}$ de EGCG resultou em bloqueio do CC em G_0/G_1 . Em câncer de próstata, EGCG ($10\text{--}80\mu\text{M}$) aumentou a expressão de p16, p18, p21, e

p53, associados com a regulação negativa da progressão do CC (GUPTA et al., 2000; GUPTA; HUSSAIN; MUKHTAR, 2003). EGCG também foi capaz de diminuir a expressão de proteínas do ciclo celular (MASUDA; SUZUI; WEINSTEIN, 2001)

Por outro lado, o estresse oxidativo provocado por concentrações elevadas (100 μ M) de polifenóis derivado do chá verde induz a apoptose em células tumorais. A administração por via oral de 6mg de chá verde/mL e tópica 6,5 μ mol aumentou o número de células apoptóticas em modelos *in vivo* (camundongos) de câncer de pulmão e pele (AHMAD et al., 1997).

Não obstante, existem estudos científicos relacionados a administração do chá verde e a inibição da via proteassoma-ubiquitina, que resulta na desregulação de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e na indução da apoptose (LAMBERT; YANG, 2003). E a via NF- κ B também pode estar comprometida, o que aumenta a sensibilidade das células tumorais ao tratamento quimioterápico (GUPTA; HUSSAIN; MUKHTAR, 2003).

O flavonóide baicalin, isolado das raízes de *Scutellaria baicalensis*, foi estudado por Chan et al. (2000) através de ensaios *in vitro* com o intuito de avaliar sua atividade antitumoral utilizando as linhagens tumorais de câncer de próstata DU145, PC-3, LNCaP e CA-HPV-10. Os resultados demonstraram que o baicalin pode inibir a proliferação celular. A inibição da proliferação celular das células de câncer de próstata testadas foi associada à indução do mecanismo de morte por apoptose, evidenciada pelo método de coloração de Hoechst, em que foi possível observar a fragmentação nuclear característica, bem como outros experimentos que demonstraram a ativação de caspase-3 e clivagem de PARP, demonstrando, portanto, que o flavonóide baicalin possui efeito antitumoral direto em célula de câncer de próstata de humanos.

7. Conclusões

- A caracterização fitoquímica por CLAE dos extratos derivados de extrações convencionais e supercrítica de casca de banana Musa spp. indicou um maior teor de galocatequina no EBHE, seguido do EBAQ e finalmente o extrato derivado da ESC;
- Os EBAQ e EBHE são importantes agentes cicatrizantes uma vez que foram capazes de proporcionar total cicatrização da

lesão, nos animais submetidos ao modelo de excisão, em um período menor de tratamento em relação aos animais dos grupos controles positivo e negativo; concomitantemente observou-se o aumento progressivo do conteúdo de hidroxiprolina ao longo de todo o processo cicatricial;

- A análise de marcadores de estresse oxidativo sugere que um dos possíveis mecanismos de ação pelo qual se dá o potencial cicatrizante dos extratos de casca de banana *Musa spp.* seria através da sua capacidade de modular o ambiente redox no leito da lesão;
- O estudo histológico das lesões confirmou o potencial cicatrizante do EBAQ, uma vez que evidenciou a ocorrência de proliferação de fibroblastos e indução do processo de reepitelização;
- Extratos de casca de *Musa spp.* (EBHE e EBAQ) demonstraram potente atividade cicatrizante e antioxidante, sugerindo que, a abordagem etnofarmacológica na seleção do material para estudo pode ser bastante útil, além de agregar valor a um resíduo da indústria de alimentos;
- E, não obstante, foi possível validar parcialmente o uso etnofarmacológico advindo da medicina popular brasileira quanto à aplicação tópica de cascas de banana em lesões na pele;
- Somente EBAQ apresentou citotoxicidade *in vitro* para células do TAE;
- Tanto EBAQ quanto ESC apresentaram significativa atividade antitumoral, uma vez que o tratamento com os respectivos extratos foi capaz de interferir positivamente nos parâmetros morfohistocitológicos, além aumentar a porcentagem média de sobrevida dos animais tratados;
- Os resultados do ensaio de citotoxicidade *in vitro* e da atividade antitumoral são indicativos importantes de uma provável

aplicação destes extratos de casca de *Musa spp.* (EBAQ e ESC) no tratamento contra o câncer.

8. Perspectivas

- Realizar um estudo fitoquímico mais detalhado dos extratos da casca da banana *Musa spp.* e padronizá-los no intuito de melhor correlacionar sua composição química com as atividades antioxidante, cicatrizante e antitumoral observadas;
- Tendo em mãos a composição química mais detalhada, isso facilitaria a identificação e a associação dos possíveis mecanismos de ação e o agente responsável pelas propriedades medicinais presente nos extratos de casca de *Musa spp.*;
- Modificar as condições de pressão e adicionar co-solventes ao processo de Extração Supercrítica objetivando a otimização da extração de compostos bioativos da casca da banana *Musa spp.*;
- Outra alternativa interessante seria observar o comportamento *in vitro* de células como fibroblastos e queratinócitos frente ao tratamento com EBAQ, o qual se mostrou mais promissor no presente trabalho quanto ao seu potencial cicatrizante, bem como ao tratamento com um composto isolado;
- Em relação à avaliação do potencial antitumoral dos extratos de casca de banana *Musa spp.*, ainda é de extrema relevância a continuidade deste estudo no sentido de se trabalhar com diferentes linhagens tumorais uma vez que o que foi apresentado no presente trabalho são apenas resultados preliminares. Contudo, são indícios relevantes de que existe a possibilidade de aplicá-los na terapia contra o câncer.
- Aprimorar a avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antiproliferativa dos extratos da casca de banana *Musa spp.* evidenciada no presente estudo.

9. Referências bibliográficas

- ABUL-AL-BASAL, M. The influence of some local medicinal plant extracts on skin wound healing activity: evaluated by histological and ultra-structural studies. In: RASHED, A. N.; AFIFI, F. U.; DISI, A. M. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n.2, p. 131-136, 2003.
- ACS - American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2009**. Atlanta: American Cancer Society, 2009. 69 p.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 234-254, 1984.
- AHMAD, N. et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, p. 139-143, 1997.
- ALISSON, M.R. **The cancer handbook**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 1616 p.
- ALMEIDA, V. L. et al. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução**. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANNADURAI, G.; JUANG, R. S.; LEE, D. J. Adsorption of heavy metals from water using banana and orange peels. **Water Science and Technology**, v. 47, p. 185–190, 2004.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.
- AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 2, p. 78-91, 2008.
- BAGAEV, I. N. Flavonoids in the complex treatment of patients with pulmonary tuberculosis. In: HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BARDIYA, N.; SOMAYAJI, K. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 73-76, 1996.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BERNA, A. et al. High-pressure solubility data of system ethanol (1) +catechin (2) +CO₂ (3). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p. 157-162, 2001.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BOCEVSKA, M.; SOVOVÁ, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 360-367, 2007.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em quimioterapia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 289 p.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. New York: Marcel Dekker, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W. **Superoxide Dismutase**. Boca Raton: CRC, v. 2, p. 159-168, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 48: Regulamento Técnico para o registro de medicamentos fitoterápicos**. Brasília: ANVISA, 2004. 8 p.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. 1. ed. Chapecó-SC: Argus, 2001, 523 p.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPOS, L. M. A. S. et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413–8420, 2008.

CHAN, F. L. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. **Cancer Letters**, v. 160, p. 219-228, 2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527-602, 1979.

CHARRIER, A. et al. **L'amélioration des plantes tropicales**. 1. ed. France: CIRAD-Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, 2004. 630 p.

CHUNG, et al. Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3268–3274, 2003.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 179 p.

CLARK. R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 11, p. 647-661, 1993.

CLARKSON, B. D.; BURCHENAL, J. H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Program Clinical Cancer**, v. 1, p. 625-629, 1965.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1268 p.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**, v.17, p.153-163, 1999.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: Towards Prolongation of healthy life span: practical approaches to intervention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 435-443. 1998.

CROSS, A. R.; YARCHOVER, J. L.; CURNUTTE, J. T. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 21448-21454, 1994.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v.15, n. 6, p. 964-970, 2004.

D'ACAMPORA, A. J. et al. Um pouco da história e evolução da medicina. *Revista CCS*, v. 20, n.1, p. 65-67, 2002.

DALLOS, M. P. **Biotecnologia: bananos y plátanos**. 1. ed. Guadalupe: Colômbia, 2003. 87 p.

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: experimental solubility and empirical data correlation. *Journal of Food Engineering*, v.78, p. 1054-1059, 2007.

DAVEY, M. W.; KEULEMANS, J.; SWENNEN, R. Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. *Journal of Chromatography A*, v. 1136, p. 176-184, 2006.

DEL VALLE, J. M.; AGUILLERA, J. M. Review: high pressure CO₂ extraction: fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International*, v. 5, p. 1-24, 1999.

DRAELOS, Z. D. Botanicals as topical agents. *Clinics in Dermatology Y*, v. 19, p. 474-477, 2001.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory working hypothesis: the case of "Nerve Tonics" from the Brazilian Amazon. Intern. Found. Sci., Prov. Rep. series. Grev Turegatan, Stockholm, Sweden, v.19, p. S-11438, 1987.

EMAGA, T. H. et al. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantains peels. **Food Chemistry**, v.103, p. 590-600, 2007.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/Abertura.html>> e

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaRondonia/importancia.html>>. Acesso: 19 nov. 2009.

EPP, O.; LANDENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0,2 nm resolution. **Eur. J. Biochem.** v.133, p.51-69, 1983.

EURIDES, U. et al. Reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius). **Revista da FZVA Uruguaiana**, v. 2/3, n. 1, p. 30-40, 1996.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The world banana economy 1985-2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e00.htm>>. Acesso em 12 nov. 2009.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRESHNEY, R. I. **Freshney's culture of animal cell - a multimedia guide**. CD-ROOM. New York: John Wiley & Sons, 1999.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 58, p. 62-97, 1986.

GARVEY, W. et al. A combined elastic, fibrin and collagen stain. **Stain Technology**, v. 62, n. 6, p. 365-368, 1987.

GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; ARDELT, B. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. **Cancer Research**, v. 73, p. 3186-3192, 1999.

GOW, A. J.; STAMLER J. S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. **Nature**, v. 391, p. 169-173, 1998.

GRIENDLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GUNASEELAN, V., N. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 389-399, 2004.

GUPTA, S. et al. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (–)-epigallocatechin-3-gallate in androgen- sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 82–90, 2000.

GUPTA, S.; HUSSAIN, T.; MUKHTAR, H. Molecular pathway for (–)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 177–185, 2003.

GUPTA, A.; SINGH, R. L.; RAGHUBIR, R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 241, p. 1–7, 2002.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 21, p. 453-314, 2008.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HARBORNE, J. B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: CODY, B.; MIDDLETON, E.; HARBORNER, J. B. **Plant flavonoids biology and medicine**. New York: AlanLiss, 1986, 129 p.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 271-280, 1995.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

HERTLOG, M. G. L. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **The Lancet**, v. 342, p. 1007–1011, 1993.

HONG, D. D.; SHAH, M. Development and validation of HPLC stability-indicator assays. In: CARTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. CARTENSEN, C. T. **Drug stability: principles and practices**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p.

HOU et al. Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. **Mutation Research**, v. 555, p. 3–19, 2004.

HOUGHTON, P. J. et al. *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 100–107, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. **Produção agrícola municipal** 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=740>. Acesso em: 11 nov. 2009.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

INIBAP - International Network For The Improvement Of Banana And Plantain. **Net Working Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 2001**. France, 2002.

JOANNE, M. M. **Cosmetic ingredient handbook**. 1. ed. Washinhton, 1988. 522 p.

JONES, D. P. et al. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 210, p. 505-516, 1981.

JUNG, C. H. et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 266-274, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KANAZAWA, K.; SAKAKIBARA, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 844-848, 2000.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 8. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. 991 p.

KEHER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, p. 21-48, 1993.

KETTLE, A. J; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Report**, v. 3, p. 3-10, 1997.

KHAJEH, M. et al. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydro-distillation methods. **Food Chemistry**, v. 86, p. 587-591, 2004.

KHALIL, E. A.; AFIFI, F. U.; AL-HUSSAINI, M. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n.1, p. 104-112, 2007.

KHANNA, S. et al. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 38-42, 2001.

KNAPP, F. F.; NICHOLAS, H. J. The sterols and triterpenes of banana peel. **Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 207-214, 1969.

KONDO, K. et al. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, p.79-86, 1999.

KORKINA, L. G.; AFANAS'EV, I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 151-153, 1997.

KUMARAGURUPARAN, R. et al. Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 275-279, 2002.

KUMIN, A. et al. Peroxiredoxin 6 is required for blood vessel integrity in wounded skin. In: SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacology Research**, v. 58, n. 2, p. 165-171, 2008.

LAMBERT, J. D.; YANG, C. S. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3262–3267, 2003.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LI, S.; HARTLAND, S. Influence of co-solvent on solubility and selectivity in extraction of xantines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 5, p. 7-12, 1992.

LIANG, et al. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate, **Carcinogenesis**, v. 2, p. 733–736, 1999.

LUENGTHANAPHOL, S. et al. Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat- preliminary experiments. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 3, p. 247-253, 2004.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 245- 248, 1997.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 361-370, 2000.

MARTINDALE: James, E. F.; Reynolds, E. (Ed), **Martindale: The Extra Pharmacopoeia**. 33. ed. London: Pharmaceutical Press.
Electronic version In: Micromedex® Healthcare Series, Greenwood Village, Colorado (Edition expires [date]), 2009. MERCK SHARP & DOHME. Disponível em: <<http://www.msdonline.com.br>>. Acesso em 16 nov. 2009.

MASUDA, M.; SUZUI, M.; WEINSTEIN, I. B. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 4220–4229, 2001.

MAU, J. L. et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 641-649, 2005a.

MAU, J. L. et al. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 589-597, 2005b.

MENSAH, A. Y. et al. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219–226, 2001.

MILLER, D. K.; LENARD, J. Antihistaminics, local anaesthetics and other amines as antiviral agents. In: HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* v. 247, p. 188-192, 1972.

MOFFAT, J. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3 action. **Carcinogenesis**, v.21, n.12, p. 2151-2157, 2000.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **eCAM**, p. 1-6, 2007.

NAYAK, B. S.; UDUPA, A. L.; UDUPA, S. L. Effect of *Ixora coccinea* flowerson dead space wound healing in rats. **Fitoterapia**, v. 70, p. 233–236, 1999.

NEBERT, D. W. et al. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 65-85, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products.**, v. 70, p. 461–477, 2007.

NIJVELDT, R. J. et al. Low arginine plasma levels do not aggravate renal blood flow after experimental renal ischaemia/reperfusion. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 22, n. 31, p. 232-239, 2001.

NO, J. K. et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. **Life Sciences**, v. 65, n. 21, p. 241-246, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉ, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OGASAWARA, M.; MATSUNAGA, T.; SUZUKI, H. Differential effects of antioxidants on the *in vitro* invasion, growth and lung metastasis of murine colon cancer cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 200-204, 2007.

OLIVEIRA, S. T. et al. Preparations of comfrey (*Symphytum officinale* L.) on cutaneous wound healing in rats. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7, p. 61-5, 2000.

ONWUKA, C. F. I., ADETILOYE, P. O., AFOLAMI, C. A. Use of household wastes and crop residues in small ruminant feeding in Nigeria. **Small Ruminant Research**, v. 24, p. 233–237, 1997.

OUAISSI, A.; OUAISSI, M.; SERENO, D. Glutathione S-transferases and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. **Immunology Letters**, v. 81, p. 159-164, 2002.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524- 526, 1987.

PANCHATCHARAM, M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, p. 87–96, 2006.

PARIHAR, A. et al. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v. 3/4, p. 6 -1 7, 2008.

PASQUEL, A. et al. Extraction of Stevia glycosides with CO₂ + ethanol and CO₂+water+ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n.3, p 271-282. 2000.

PATTANAYAK, S. P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcate* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 241-247, 2008.

PAUL, A. A.; SOUTHGATE, D. A. T. **McCance and Widdowson's the composition of foods**. 4. ed. Amsterdam : Elsevier-North, 1978. 108 p.

PELLEGRINI, N. et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assay. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2812–2819, 2003.

PEREIRA, J. R. C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cepalin, heparina e alantoína. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n.8, p. 603-608, 2003.

PEREZ-PEREZ, E. M. et al. Antioxidant capacity of crude extracts from clones of banana and plane species. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 4, p. 517-523, 2006.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

POLLA, A. S.; POLLA, L. L.; POLLA, B. S. Iron as the malignant spirit in successful ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 2, p. 25-37, 2003.

POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of Natural antioxidants. In: POKORNY, J.; ANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**. New York: CRC Press, 2001. 430 p.

PRASAD, S. B.; GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 32, p. 155-162, 1994.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 657-667, 1986.

QUISPE-CONDORI, S. et al. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.36, p.40-48, 2005.

QUERESHI, S. et al. Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 165, p. 1-11, 2001.

RASHED, A. N.; AFIFI, F. U.; DISI, A. M. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. **Journal of ethnopharmacology**, v. 88, n. 2, p. 131-136, 2003.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284, 2002.

REBELLO, J. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004, 112 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-

Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, p. 225-229, 1996.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICHERS, D. W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum, 1996. 178 p.

ROBARDS, K. Strategies for the determinations of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 657-691, 2003.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. :364-369, 2001.

ROMERO, N.; DENICOLA, A.; RADI, R. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 368, p. 23-30, 1999.

ROY, S. et al. Dermal wound healing is subject to redox control. **Molecular Therapy**, v.13, p. 211-20, 2006.

RUSTIGI, A. K.; PODOLSKY, D. K. The molecular basis of colon cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 43, p. 61-68, 1996.

SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 330-337, 2007.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007. 147 p.

SCANDALIOS, J. G. Introduction to oxyradicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacology Research**, v. 58, n. 2., p. 165-171, 2008.

SEERAM, N. P.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. **Nutrition and Cancer**, v. 46, n. 1, p. 101-106, 2003.

SEN, C. K. et al. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 239-249, 2002.

SHAIIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. 319 p.

SHESTOPALOV, A. V. et al. Biological functions of allantoin. **Biology Bulletin**, 2006, v. 33, n. 5, p. 437-440, 2006.

SHETTY, S.; UDUPA, S.; UDUPA, L. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats. **eCAM** doi:10.1093/ecam/nem004, v. 5, n. 1, p. 95-101, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative stress**. United Sates of America: Academic press, 1985. 195 p.

SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, n. 6, 2004, Joinville. **Banana ‘Enxerto’, uma brasileira centenária**. Joinville: LICHTENBERG, L. A.; MOREIRA, R. S., 2004. p. 243-250.

SINCLAIR, R. D.; RYAN, T. J. A great war for antiseptics. **Wound management**, v. 4, n. 1, p. 16-18, 1993.

SINGH, M. et al. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 67-72, 2006.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738-746, 1999.

- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 765.
- SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.
- SOMEYA, S.; YOSHIKI, Y.; OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). **Food Chemistry**, v. 79, p. 351–354, 2002.
- STEBBENS, W. E. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 77, n. 2, p. 121-132, 2004.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133,1990.
- SUN, J. et al. Antioxidant and autoproliiferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.
- SÜNTAR, I. P. et al. Assessment of wound healing activity of the aqueous extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. **Fruits and Leaves**, eCAM doi:10.1093, p. 1-7, 2009.
- SVOBODOVÁ, A.; WALTEROVÁ, D.; PSOTOVÁ, J. Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. **Burns**, v. 32, p. 973–979, 2006.
- TELSER, A. G.; YOUNG, J. K.; BALDWIN, K. M. **Histologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 445 p.
- TEWARI, H. K.; MARWAHA, S. S.; RUPAL, K. Ethanol from bananas peels. **Agricultural Wastes**, v. 16, n. 2, p. 135–146, 1986.

TSUDA, T. et al. Antioxidants pigments isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2671-2674, 1994.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VECKENSTEDT, A.; PUSZTAI, R. Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. In: HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology Therapy**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIJAYAKUMAR, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia**, v. 79, p. 279-282, 2008.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-330, 1995.

WHO - World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

WILHELM FILHO, D.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 2879-2882, 1994.

XU, X.; YU, L.; CHEN, G. Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 493-499, 2006.

YOUNG, B. et al. **Histologia Funcional: texto e atlas em cores**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 436 p.

ZANCAN, K. C. et al. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 1, p. 57-76, 2002.

ZHANG, P. et al. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 443–458, 2005.

ZIMERMANN, L. M.; VEITH, I. **Great ideas in the history**. Baltimore Wilkins & Wilkins Co., 1961. 132 p.